



**Cátia Sofia Ribeiro dos Santos Silva**  
Mestre

## **Desenvolvimento de Metodologias para Análise Elementar de Osso com Patologia**

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Adelaide Pedro Jesus, Professora Catedrática,  
FCT/UNL

Co-orientador: Jaime Branco, Professor Catedrático,  
FCM/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Catedrática Maria Luísa Dias de Carvalho de Sousa  
Leonardo

Arguente(s): Prof. Catedrático Miguel Àngel Respaldiza  
Prof. Doutora Maria Teresa Ferreira Marques Pinheiro

Vogais: Prof. Doutor João Duarte Neves Cruz  
Prof. Doutor Fernando Manuel Pimentel dos Santos  
Prof. Catedrático Joaquim Marques Ferreira dos Santos



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Dezembro de 2016**

## **Desenvolvimento de Metodologias para Análise Elementar de Osso com Patologia**

Copyright © Cátia Sofia Ribeiro dos Santos Silva, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

# Agradecimentos

---

O meu sincero agradecimento,

Ao meu marido Hugo Silva pelo apoio incondicional e pela ajuda imprescindível nos muitos dias passados nas instalações do acelerador tandem. Aos meus pais pelo incentivo permanente e por me apoiarem sempre nos momentos difíceis. Aos meus irmãos e cunhados com quem compartilhei todos os momentos importantes da minha vida e pela sua ajuda e apoio. À minha sogra, por estar sempre presente.

Aos meus orientadores, Professora Doutora Adelaide Pedro de Jesus e Professor Doutor Jaime Branco por tudo o que me ensinaram e por todo o apoio prestado durante o doutoramento e que foi fundamental para a conclusão do plano de trabalhos. Um especial agradecimento à professora Adelaide por participar sempre na preparação das minhas apresentações orais!

Ao Professor Doutor João Cruz, ao Doutor Hélio Luís e à Doutora Micaela Fonseca por estarem sempre disponíveis para ajudar em qualquer situação e por todo o apoio prestado durante o tempo de análise.

Ao Jorge Rocha e à Filomena Batista pela ajuda na manutenção e na resolução de problemas técnicos e mecânicos do acelerador tandem.

À Doutora Victoria Corregidor e ao Doutor Luís Alves que deram um grande impulso no meu doutoramento e que me ajudaram a desenvolver uma postura mais crítica na análise dos resultados.

Aos meus amigos, sobretudo à Patrícia Limede, sempre disponível para me apoiar nos momentos mais difíceis e de maior incerteza.

À Doutora Teresa Pinheiro que sempre se mostrou disponível para qualquer esclarecimento de dúvidas.

Ao Doutor Mauro por toda a ajuda com as análises no M4-Tornado e na análise dos espectros no WINAXIL, e pelo seu apoio na discussão dos resultados.

À Rute Pinheiro por estar sempre disponível e pronta a ajudar.

Ao Bruno Vidal por me ter ajudado na preparação das amostras ósseas.

Ao Dr. Luís Duarte pelo seu interesse no trabalho e pela ajuda na obtenção de amostras ósseas.

À d. Luiza Oliveira por toda a ajuda, apoio e carinho.

À professora Maria Luísa Carvalho e ao professor José Paulo por todo o apoio.

Aos meus gatinhos pela companhia durante as longas horas de trabalho ao computador!

Ao meu padrinho António, ao meu sogro José Inácio e aos que apesar de não estarem presentes tenho a certeza que me ajudaram de alguma forma.

## Resumo

---

As doenças ósseas como a osteoporose e a doença óssea de Paget têm efeitos severos na qualidade de vida do paciente. O conteúdo relativo de cálcio e fósforo é fundamental para manter a homeostasia mineral e o metabolismo ósseo. A investigação da composição elementar dos elementos maioritários e elementos-traço poderá dar também um importante contributo para o desenvolvimento de biomarcadores da saúde óssea. Compreende-se assim a importância da validação de metodologias para análise de amostras ósseas que permitam a obtenção de informação fiável sobre a composição elementar, que é o que se pretende com o presente trabalho.

As técnicas de PIXE (*Particle Induced X-ray Emission*), PIGE (*Particle Induced Gamma-ray Emission*),  $\mu$ -PIXE e  $\mu$ -XRF ( *$\mu$ -X-Ray Fluorescence spectroscopy*), foram aplicadas para análise da composição elementar de amostras ósseas saudáveis e afetadas com osteoporose e com doença óssea de Paget. É o primeiro estudo da composição elementar e da razão Ca/P em amostras de osso pagético “vivo”. Também é o primeiro estudo em que a técnica de PIGE é aplicada para quantificação de fósforo em amostras ósseas, sem recurso a materiais de referência padrão. Para que tal fosse possível, foi determinada a seção eficaz para a reação de dispersão inelástica de prótons por  $^{31}\text{P}$  para a gama de energias 2-4 MeV. De referir também que o método escolhido para preparação das amostras ósseas permite uma análise dos elementos maioritários e traço ao longo do osso, no sentido em que é aplicada a carga mecânica. Este tipo de análise da distribuição dos elementos no osso foi realizado pela primeira vez neste trabalho e, no caso da doença óssea de Paget permite de certa forma avaliar a extensão da doença no osso.

Os resultados das análises das amostras ósseas permitem concluir que as técnicas de PIXE, PIGE e  $\mu$ -XRF permitem a identificação e quantificação de vários elementos nas amostras ósseas. As técnicas de análise por feixe de iões permitem distinguir entre diferentes tipos de osso e ver claramente as diferenças entre osso saudável e osso com patologia quando se analisa a razão Ca/P ou a concentração de outros elementos, o que não foi possível com as análises de  $\mu$ -XRF. A análise de osso afetado com doença óssea de Paget revelou a presença de elevadas concentrações de chumbo na cartilagem, um elemento altamente tóxico que afeta o metabolismo ósseo atuando diretamente nas funções dos osteoclastos e dos osteoblastos. Por

outro lado, os resultados obtidos para a razão Ca/P e a concentração de zinco para cada osso parece indicar uma correlação com o tipo de patologia.

**Palavras-chave:** doenças ósseas, osteoporose, doença óssea de Paget, PIXE, PIGE,  $\mu$ -XRF, elementos majoritários, elementos traço.

Bone diseases such as osteoporosis and Paget's disease of bone (PDB) have harmful effects on patient's quality of life. The relative content of calcium and phosphorous is crucial to maintain bone metabolism and mineral homeostasis. The investigation of elemental composition of major and trace elements may give an important contribution to the development of bone health biomarkers. This is the reason why it is important the validation of methodologies for bone samples analysis to obtain viable information about elemental composition, which is the main purpose of this work.

Ion beam analysis techniques, PIXE, (Particle Induced X-ray Emission), PIGE (Particle Induced Gamma-ray Emission),  $\mu$ -PIXE and also  $\mu$ -XRF ( $\mu$ -X-ray Fluorescence spectroscopy) were applied to the analysis of the elemental composition of healthy bones, but also bones with osteoporosis and Paget's disease of bone. It is the first study of elemental composition and measurement of Ca/P ratio for bone samples affected with Paget's disease of bone. It is also the first study where PIGE technique was applied for phosphorous quantification without standard reference materials. To do that, the cross section for inelastic scattering of protons by  $^{31}\text{P}$  was measured for the energy range 2-4 MeV. Also, the method chosen for bone samples preparation allow the analysis of major and trace elements in the same direction of the applied mechanic loading. This type of analysis of element distribution in bones was performed for the first time in this work and for Paget's disease of bone it was possible to identify the extension of the disease in the bone.

The results show that PIXE, PIGE and  $\mu$ -XRF techniques allow a qualitative and quantitative analysis of bone samples for many elements. The results of ion beam analysis techniques show differences between healthy and diseased bones, for Ca/P ratio and also for the concentration of other elements. It was not possible to distinguish between healthy and diseased bone using  $\mu$ -XRF results. However,  $\mu$ -XRF analysis of PDB bone revealed high concentrations of lead, a highly toxic element that affects bone metabolism acting directly on osteoclasts and osteoblasts functions. The correlation between zinc concentrations and Ca/P ratio for each bone seems to indicate a linear relationship for bones affected with osteoporosis, and this may be a suitable index for diagnosis.

**Keywords:** bone diseases, osteoporosis, Paget's disease of bone, PIXE, PIGE,  $\mu$ -XRF, major elements, trace elements.





# Índice

<b>Resumo .....</b>	<b>v</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de Acrónimos.....</b>	<b>xxi</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Bases de Anatomia e Patologias Ósseas.....</b>	<b>5</b>
<b>Microestrutura Óssea.....</b>	<b>6</b>
<b>Fisiologia e metabolismo ósseo – remodelação óssea.....</b>	<b>10</b>
<b>Osteoporose e Doença Óssea de Paget .....</b>	<b>11</b>
1. Osteoporose .....	11
A. Epidemiologia .....	12
B. Alterações na remodelação óssea e nas propriedades estruturais do osso .....	13
C. Etiologia.....	14
D. Fatores de risco .....	15
2. Doença Óssea de Paget.....	17
A. Epidemiologia .....	18
B. Alterações da Remodelação Óssea e propriedades estruturais do osso .....	18
C. Etiologia.....	19
<b>Elementos Maioritários e Elementos Traço e sua Função no Metabolismo e Saúde Ósseos.....</b>	<b>21</b>
1. Elementos maioritários da matriz mineral do osso.....	23
2. Influência dos elementos traço no metabolismo ósseo.....	25
A. Elementos traço essenciais.....	25
□ Zinco.....	25
□ Silício .....	27
B. Elementos traço essenciais e potencialmente tóxicos .....	27
□ Estrôncio.....	27

<input type="checkbox"/> Flúor .....	28
<input type="checkbox"/> Ferro .....	28
<input type="checkbox"/> Cobre, Crómio e Manganésio.....	29
C. Elementos Traço Tóxicos .....	29
<input type="checkbox"/> Cádmio .....	29
<input type="checkbox"/> Chumbo .....	30
<b>2. Bases Físicas das Técnicas Aplicadas para Análise Elementar do Osso .....</b>	<b>31</b>
<b>Estudos da composição elementar do osso .....</b>	<b>32</b>
1. PIXE - Emissão de Raios-X Induzida por Partículas Carregadas .....	33
A. Princípio Físico da Técnica de PIXE .....	33
B. Espectro de raios-X.....	35
C. Poder de Paragem, Alcance e secção eficaz .....	37
D. Relação entre intensidades de raios-X e concentração .....	40
2. PIGE - Emissão de Radiação-Gama Induzida por Partículas Carregadas .....	42
A. Princípio Físico da Técnica de PIGE .....	43
B. Espectro de radiação Gama .....	44
C. Poder de Paragem, Alcance e Secção Eficaz .....	46
D. Relação entre intensidades de radiação $\gamma$ e concentração .....	47
3. Micro - Fluorescência de Raios-X.....	48
A. Princípio Físico da Técnica.....	48
B. Espectro de raios-X.....	50
C. Secção eficaz total de colisão e Coeficiente mássico de atenuação.....	52
D. Relação entre intensidades de raios-X e concentração .....	53
<b>3. Descrição das Instalações Experimentais.....</b>	<b>55</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>56</b>
1. Acelerador Tandem .....	56
A. Procedimentos experimentais no acelerador tandem .....	63
<input type="checkbox"/> Filamento da Fonte de Iões .....	63
<input type="checkbox"/> Calibração em Energia do Acelerador .....	64
2. M4 – Tornado .....	67
3. Microsonda Nuclear .....	71
<b>4. Medição da Secção Eficaz da Reação <math>^{31}\text{P}(\text{p},\text{p}'\gamma)^{31}\text{P}</math>.....</b>	<b>75</b>

<b>Introdução e Revisão da Literatura .....</b>	<b>76</b>
<b>Preparação e Caracterização do Alvo .....</b>	<b>77</b>
<b>Condições Experimentais.....</b>	<b>80</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>82</b>
<b>5. Otimização de Procedimentos para Análise das Amostras de Osso .....</b>	<b>87</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>88</b>
<b>Análise de uma amostra de osso da anca.....</b>	<b>90</b>
1. Preparação da Amostra.....	90
2. Condições Experimentais .....	91
3. Resultados.....	92
<b>Métodos de Preparação de Amostras .....</b>	<b>97</b>
1. Preparação das Amostras.....	97
2. Condições Experimentais .....	98
3. Resultados.....	99
<b>6. Distribuição Elementar no Osso com Patologia .....</b>	<b>105</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>106</b>
<b>Obtenção das Amostras Ósseas: Comissão de Ética e Consentimento Informado ....</b>	<b>108</b>
<b>Preparação das Amostras Ósseas.....</b>	<b>109</b>
<b>Condições Experimentais.....</b>	<b>110</b>
1. Análises PIXE/PIGE.....	110
2. Análises $\mu$ -XRF.....	114
3. Resultados da Análise das Amostras de Osso .....	116
A. Osso Saudável.....	116
B. Doença Óssea de Paget .....	123
C. Osteoporose.....	129
<b>Discussão dos Resultados .....</b>	<b>142</b>
1. Viabilidade das Técnicas .....	142
2. Análise da Patologia .....	145
<b>Conclusões .....</b>	<b>150</b>

<b>Referências .....</b>	<b>152</b>
<b>Anexo 1 .....</b>	<b>160</b>
<b>Anexo 2 .....</b>	<b>164</b>
<b>Anexo 3 .....</b>	<b>178</b>
<b>Anexo 4 .....</b>	<b>179</b>
A. Osso Saudável .....	179
B. Osso com Doença Óssea de Paget .....	180
C. Osso osteoporótico 1 .....	181
D. Osso Osteoporótico 2 .....	182
E. Osso Osteoporótico 3 .....	183
F. Osso Osteoporótico 4 .....	184

# Índice de Figuras

Figura 1) (A) Representação da microestrutura do osso cortical e do osso trabecular; (B) Esquematização da orientação das fibras de colagénio [18].....	7
Figura 2) Imagem de uma análise SEM ( <i>Scanning Electron Microscopy</i> ) de uma secção de cabeça do Fémur de gato, onde é possível observar claramente os sistemas de Havers, incluindo as lacunas e localizações dos osteócitos. Esta análise de SEM foi realizada com eletrões retrodispersos (BSE – <i>Backscattered Electrons</i> ) usando um microscópio da JEOL JSM 7001 F equipado com um espectrómetro EDS da INCA Oxford Instruments [27].....	8
Figura 3) Distribuição dos três tipos de cartilagem, cartilagem hialina, fibrocartilagem e cartilagem elástica no corpo [18].....	9
Figura 4) Incidência de fraturas osteoporóticas em homens e mulheres nos distritos de Portugal Continental. Os diferentes tons de castanho mostram as taxas de incidência por cada 100000 habitantes [47].....	13
Figura 5) Comparação entre osso trabecular saudável e osso trabecular com osteoporose [52].....	14
Figura 6) Tabela periódica com identificação dos elementos essenciais, elementos possivelmente essenciais e elementos tóxicos [92].....	22
Figura 7) Modelo esquemático da relação entre o zinco e a densidade mineral óssea. O gráfico mostra o decréscimo da massa mineral do osso com a idade e o efeito do zinco no osso com o avanço da idade [105].....	26
Figura 8) Rendimento da emissão de raios-X e rendimento da emissão de eletrões de Auger em função do número atómico dos elementos, Z [128].....	34
Figura 9) Espectro de $\mu$ -PIXE obtido na análise de uma amostra de osso do fémur de gato na microsonda nuclear no LATR-CTN/IST com um feixe de prótons de 2 MeV.....	36
Figura 10) Alcance de um feixe de $H^+$ com energia 2800 keV em (a) tecido da cartilagem e (b) tecido esponjoso.....	39
Figura 11) Esquematização do processo de formação e deteção de raios-X.....	40
Figura 12) Espectro gama obtido pela análise PIGE de amostra de osso do fémur humano com um feixe de $H^+$ com energia 2.8 MeV.....	45
Figura 13) Interação dos raios-X com a matéria [144].....	49
Figura 14) Espectro de raios-X de uma amostra de osso saudável analisada por $\mu$ -XRF no M4-Tornado da Bruker (FCT-UNL), nas condições 50 kV, 100 $\mu$ A sem filtros.....	51
Figura 15) Espectro de raios-X de uma amostra de osso saudável analisada por $\mu$ -XRF no M4-Tornado da Bruker (FCT-UNL), nas condições 50 kV, 600 $\mu$ A com um filtro de Al/Ti/Cu – 100/50/25 $\mu$ m.....	51

Figura 16) Esquematização da geometria de excitação e detecção da radiação característica da amostra.....	53
Figura 17) Instalação do acelerador tandem e linha de reações nucleares.....	57
Figura 18) Acelerador Tandem de 3 MV do LATR/CTN-IST.....	58
Figura 19) Chapa de tântalo que constitui o sistema de colimadores posicionados a seguir ao triplete onde é possível ver o suporte de encaixe da peça de quartzo para focagem do feixe. Os colimadores têm 2, 5 e 3 mm de diâmetro [151].....	59
Figura 20) Chapa de níquel que protege a peça de plástico à entrada da câmara [151].....	60
Figura 21) Colimador de níquel e folha de ouro [151].....	60
Figura 22) Interior da câmara em que é possível ver a (A) estrutura em forma de ‘degrau’ colocada em frente ao sistema de colimadores, o (B) canhão de elétrons e (C) uma estrutura colocada atrás do porta-amostras, o <i>beam stopper</i> , que para o feixe em análises de alvos finos. É também possível ver o (D) detetor de radiação gama e (E) a manga do detetor de raios -X.....	62
Figura 23) Sistema de Vácuo da Linha de Reações Nucleares. Legenda: (1) Válvula Manual – permite a ligação de uma bomba rotatória caso seja necessário restabelecer o vácuo primário da linha, permitindo também a entrada de ar; (2) Bomba Turbomolecular da <i>Varian</i> com capacidade de bombeamento de 250 l/s; (3) Bombas rotatórias da <i>Varian</i> ; (4) Medidor Pirani; (5) Medidor Penning; (6) Válvula manual; (7) Válvula manual onde é possível fazer entrar ar na câmara e ligar a bomba rotatória para fazer o vácuo primário; (8) Medidor Penning; (9) Bomba turbomolecular da <i>Pfeiffer</i> com capacidade de bombeamento de 100 l/s; (10) Bombas rotatórias da <i>Pfeiffer</i> .....	63
Figura 24) Malha de platina do filamento após limpeza com água-régia [151].....	64
Figura 25) Dados experimentais e ajustes gaussianos para as ressonâncias $^{19}\text{F}(p, \alpha\gamma)\text{O}^{16}$ (872 e 1371 keV), $^{27}\text{Al}(p, \gamma)\text{Si}^{28}$ (992 keV) e $^{23}\text{Na}(p, p'\gamma)\text{Na}^{23}$ (1645.1 keV).....	65
Figura 26) Reta de calibração em energia do acelerador tandem obtida experimentalmente.....	66
Figura 27) (a) Esquematização da geometria de excitação e de detecção do espectrómetro M4 -Tornado; (b) Espectrómetro M4-Tornado (Bruker, UK) [152].....	67
Figura 28) Esquematização do funcionamento do tubo de radiação [153].....	67
Figura 29) Espectro típico de um tubo de raios-X com um ânodo de tungstênio [154].....	68
Figura 30) Sistema de policapilares utilizados para focar o feixe de raios-X em técnicas de micro-fluorescência de raios-X [155].....	69
Figura 31) Esquematização da linha de PIXE e microsonda nuclear do laboratório de feixes de iões do LATR-CTN/IST [124].....	71
Figura 32) Fotografia do bloco terminal da microsonda nuclear da Oxford Microbeams [148].....	72
Figura 33) Interior da câmara experimental da microsonda nuclear.....	72
Figura 34) Esquema da geometria de detecção em análises RBS.....	78
Figura 35) Ajuste do espectro de RBS do alvo de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ com o programa SIMNRA.....	79

Figura 36) Espectro do rendimento de radiação gama produzida no bombardeamento de um filme fino de $\text{Ca}_3(\text{PO})_2$ evaporado sobre um filme fino de Ag com prótons com 3.1 MeV de energia.....	80
Figura 37) Espectro dos prótons dispersos pelo alvo para $\theta=155^\circ$ , para um feixe incidente de $\text{H}^+$ de energia 3.0 MeV.....	81
Figura 38) Gráfico da eficiência absoluta do detector em função da energia, obtida com as fontes radioativas $^{133}\text{Ba}$ , $^{56}\text{Co}$ e $^{152}\text{Eu}$ .....	83
Figura 39) Gráfico que mostra a dependência do rendimento de partículas com o inverso do quadrado da energia.....	83
Figura 40) Função de excitação da reação de dispersão inelástica $^{31}\text{P}(\text{p},\text{p}'\gamma)^{31}\text{P}$ para o canal de saída $\gamma=1266$ keV determinada experimental para $\theta_{\text{Lab}} = 130^\circ$ . Encontram-se também representadas as funções de excitação publicadas por Boni et al. e Jokar et al.....	84
Figura 41) Imagem da amostra de osso osteoporótico analisada, onde é possível ver os dois tipos de tecido ósseo, cortical e esponjoso.....	91
Figura 42) Distribuição elementar 2D do Ca, P e Fe ao longo da secção do osso ( $2640 \times 2640 \mu\text{m}^2$ ).....	92
Figura 43) Espectro de $\mu$ -PIXE obtido para o tecido trabecular (região 1).....	93
Figura 44) Espectro de $\mu$ -PIXE obtido para o tecido cortical (região 2).....	93
Figura 45) Espectro de $\mu$ -PIXE obtido para o tecido cortical usando um filtro de perspex com 1 mm de espessura (região 2).....	93
Figura 46) Espectro de $\mu$ -EBS para o osso trabecular.....	94
Figura 47) Espectro de $\mu$ -EBS para o osso cortical.....	94
Figura 48) Esquematisação do corte efetuado nas amostras de cabeça do fémur.....	97
Figura 49) Imagem da secção número 3, (a) lavada com água destilada e (b) lavada com etanol e clorofórmio.....	98
Figura 50) Distribuição elementar 2D de $\mu$ -PIXE ( $2120 \times 2120 \mu\text{m}^2$ ) do Ca (esquerda) e do P (direita) para a (a) amostra lavada com água destilada e a (b) amostra lavada com etanol e clorofórmio.....	99
Figura 51) Espectro de raios-X (esquerda) e espectro de $\mu$ -EBS (direita) da amostra lavada com água destilada.....	100
Figura 52) Espectro de raios-X (esquerda) e espectro de $\mu$ -EBS (direita) da amostra lavada com etanol + clorofórmio.....	100
Figura 53) Livre percurso médio de fótons de energia 50 keV e alcance de prótons de 2.8 MeV em tecido trabecular [168].....	107
Figura 54) Imagem de uma amostra de osso com indicação das áreas onde é feita a análise.....	110
Figura 55) Imagem do microscópio do espectrómetro M4-Tornado da Bruker, das amostras 2 (esquerda) e 8 (direita) do osso saudável.....	118
Figura 56) Gráfico da concentração de cálcio (% m/m) para cada uma das secções analisadas de osso saudável.....	119

Figura 57) Gráfico da concentração de fósforo (% m/m) para cada uma das secções analisadas de osso saudável.....	119
Figura 58) Gráfico da concentração de zinco (µg/g) e de estrôncio (µg/g) para cada uma das secções analisadas de osso saudável.....	120
Figura 59) Gráfico da razão Ca/P para cada uma das secções analisadas de osso saudável. A incerteza associada ao valor da razão Ca/P em cada análise é determinada a partir das incertezas associadas ao valor da concentração do cálcio e do fósforo. Os valores apresentados para cada secção correspondem à média das análises feitas em cada secção e a incerteza traduz a dispersão dos valores das análises.....	121
Figura 60) Gráfico da concentração de chumbo (µg/g) para cada secção do osso pagético (esquerda) e imagem da primeira secção de osso com DOP (direita).....	124
Figura 61) Gráfico da concentração de cálcio (%m/m) obtida para cada uma das secções de osso com DOP, por cada uma das técnicas.....	125
Figura 62) Gráfico da concentração de fósforo (%m/m) obtida para cada uma das secções com DOP, por cada uma das técnicas.....	126
Figura 63) Gráfico da concentração de zinco (µg/g) obtida para cada uma das secções com DOP, por cada uma das técnicas.....	127
Figura 64) Gráfico da concentração de estrôncio obtida para cada uma das secções com DOP, por cada uma das técnicas.....	127
Figura 65) Razão Ca/P obtida por cada uma das técnicas para todas as secções do osso com DOP. A verde está representado o valor teórico da razão Ca/P para osso saudável, obtido a partir da fórmula da hidroxiapatite. A incerteza associada ao valor da razão Ca/P em cada análise é determinado a partir das incertezas associadas ao valor da concentração do cálcio e do fósforo. Os valores apresentados para cada secção correspondem à média das análises feitas em cada secção e a incerteza traduz a dispersão dos valores das análises.....	128
Figura 66) Gráficos das concentrações de cálcio (% m/m) obtidas por PIXE e por µ-XRF para os quatro ossos osteoporóticos.....	131
Figura 67) Gráficos das concentrações de fósforo (em %m/m) obtidas por PIGE e por µ-XRF para os quatro ossos osteoporóticos.....	133
Figura 68) Gráficos das concentrações de zinco (µg/g) obtidas por PIXE e por µ-XRF para quatro ossos osteoporóticos.....	135
Figura 69) Gráficos das concentrações de estrôncio (µg/g) obtidas por PIXE e por µ-XRF para os quatro ossos osteoporóticos.....	137
Figura 70) Gráficos da razão Ca/P obtidas por PIXE/PIGE e por µ-XRF para os quatro ossos osteoporóticos.....	138



Figura 71) (a) Secção número 3 do osso osteoporótico 2 e mapeamento de cálcio (b) obtido por $\mu$ -PIXE na microsonda nuclear no CTN/IST e (c) obtido por $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker.....	143
Figura 72) Gráfico da razão Ca/P para todas as secções para cada tipo de osso. Os valores apresentados correspondem aos valores médios para cada secção e a incerteza é calculado com base na dispersão.....	146
Figura 73) Razão Ca/P para tecido trabecular para todas as amostras analisadas.....	147
Figura 74) Gráfico da concentração de cálcio (% m/m) para osso saudável, osso com DOP e osso com osteoporose.....	147
Figura 75) Gráfico da concentração de fósforo (% m/m) para osso saudável, osso com DOP e osso com osteoporose.....	148
Figura 76) Gráfico da concentração de zinco ( $\mu\text{g/g}$ ) para osso saudável, osso com DOP e osso com osteoporose.....	148
Figura 77) Gráfico da concentração de estrôncio ( $\mu\text{g/g}$ ) para osso saudável, osso com DOP e osso com osteoporose.....	148
Figura 78) Gráfico da concentração de zinco ( $\mu\text{g/g}$ ) em função da razão Ca/P para todas as amostras de osso.....	149

# Índice de Tabelas

Tabela 1) Fatores de risco da osteoporose.....	16
Tabela 2) Resultados das energias das ressonâncias obtidas experimentalmente para cada valor de diferença de potencial (ddp). A energia da ressonância experimental é a que se obtém utilizando a equação da reta indicada no gráfico de ajuste linear da figura 26.....	66
Tabela 3) Resultados da fração atômica de fósforo aferida a partir do rendimento gama da análise de uma pastilha de fosfato de cálcio para várias energias.....	85
Tabela 4) Concentração dos elementos identificados no espectro de $\mu$ -PIXE para o tecido trabecular (1) e diferentes partes do tecido cortical (2 e 3). Não foi possível determinar as concentrações de bromo, estrôncio e cobre para o osso trabecular (n.d.). As incertezas apresentadas são calculadas com base nos valores da incerteza do ajuste e da incerteza experimental que são fornecidas no ficheiro de output do GUPIX.....	95
Tabela 5) Resultados da análise por $\mu$ -PIXE na microsonda nuclear para a amostra lavada com água destilada e para a amostra lavada com etanol e clorofórmio. A razão Ca/P é calculada para cada área analisada. O resultado apresentado corresponde ao valor médio dos valores obtidos e a incerteza é obtida através da dispersão dos resultados experimentais.....	101
Tabela 6) Resultados da análise por $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker para a amostra lavada com água destilada e para a amostra lavada com etanol e clorofórmio. A razão Ca/P é calculada para cada área analisada. O resultado apresentado corresponde ao valor médio dos valores obtidos e a incerteza é obtida através da dispersão dos resultados experimentais.....	101
Tabela 7) Resultados da análise por $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker das amostras 1, 2, 3 e 9 de ambos os ossos. A razão Ca/P é calculada para cada área analisada. O resultado apresentado corresponde ao valor médio dos valores obtidos e a incerteza é obtida através da dispersão dos resultados.....	102
Tabela 8) Resultados da análise num equipamento EDXRF triaxial das amostras de osso lavadas com água destilada. O processo de análise e quantificação faz com que a incerteza associada a cada uma destas amostras seja superior ao obtido por $\mu$ -XRF.....	103
Tabela 9) Resultados da análise por PIXE de um alvo de Au /Ag /Cu (90.0/9.5/0.5 %).....	112
Tabela 10) Resultados da análise por PIXE e PIGE do padrão Caprine Bone usando um feixe de prótons com energias 2611.1 keV, 2787.8 keV, 2986.6 keV e 3775.4 keV. São também indicados os valores do o nas condições de análise sem filtros.....	115
Tabela 11) Resultados da análise por PIXE e PIGE do padrão Bone Meal usando um feixe de prótons com energias 2611.1 keV, 2787.8 keV, 2986.6 keV e 3775.4 keV. São também indicados os valores do certificado.....	112

Tabela 12) Resultados da análise dos materiais de referência padrão, Bone Ash e Bone Meal e comparação com os valores do certificado nas condições de análise sem filtros.....	115
Tabela 13) Resultados da análise dos materiais de referência padrão, Bovine Bone e Caprine Bone e comparação com os valores do certificado da análise de uma amostra de osso saudável por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do LATR-CTN/IST. A concentração de Ca, Zn e Sr para as várias secções foram obtidas por PIXE. A concentração de P foi obtida por análise PIGE. As células a sombreado correspondem a amostras não analisadas.....	117
Tabela 14) Resultados da análise dos materiais de referência padrão, Bone Ash e Bone Meal e comparação com os valores do certificado nas condições de análise com filtros.....	115
Tabela 15) Resultados da análise dos materiais de referência padrão, Bovine Bone e Caprine Bone e comparação com os valores do certificado nas condições de análise com filtros.....	115
Tabela 16) Resultados do certificado. Este padrão está certificado apenas para o chumbo.....	116
Tabela 17) Concentrações de cálcio, fósforo e potássio e razão Ca/P obtidas para todas as amostras de osso saudável por $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker na FCT/UNL. As células a sombreado correspondem a amostras não analisadas.....	117
Tabela 18) Concentrações de zinco, estrôncio e chumbo, obtidas para todas as amostras de osso saudável por $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker na FCT/UNL. As células a sombreado correspondem a amostras não analisadas.....	117
Tabela 19) Resultados da análise da secção número 8 de osso saudável por $\mu$ -PIXE na microsonda nuclear no LATR-CTN/IST. A análise foi feita em vários pontos na secção e o valor apresentado é o valor médio das concentrações registadas e a incerteza traduz a dispersão dos resultados.....	122
Tabela 20) Resultados da análise da amostra com doença óssea de Paget por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST. Só foi possível quantificar o chumbo para a amostra número 2.....	123
Tabela 21) Concentrações de cálcio, fósforo e potássio e razão Ca/P obtidas para todas as secções de osso com doença óssea de Paget por $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker na FCT/UNL.....	123
Tabela 22) Concentrações de zinco, estrôncio e chumbo para todas as amostras com doença óssea de Paget por $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker na FCT/UNL.....	124
Tabela 23) Resultados da análise da amostra 10 por $\mu$ -PIXE na microsonda nuclear no LATR-CTN/IST. As concentrações apresentadas correspondem ao valor médio das análises efetuadas em diferentes áreas da amostra sendo as incertezas calculadas com base na dispersão dos resultados.....	129
Tabela 24) Concentração de cálcio (% m/m) obtida para quatro ossos osteoporóticos por PIXE na câmara de reações nucleares do LATR-CTN/IST. As células sombreadas da tabela indicam amostras que não foram analisadas (ver texto).....	130
Tabela 25) Valores da concentração de cálcio (% m/m) obtidos para quatro ossos osteoporóticos por $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker na FCT/UNL.....	130

Tabela 26) Valores da concentração de fósforo em %m/m obtidos para quatro ossos osteoporóticos por PIGE na câmara de reações nucleares do LATR-CTN/IST.....	132
Tabela 27) Valores da concentração de fósforo em % m/m obtidos para quatro ossos osteoporóticos por $\mu$ -XRF no espectrómetro M4 - Tornado da Bruker na FCT/UNL.....	132
Tabela 28) Concentração de zinco em $\mu$ g/g obtidas para quatro ossos osteoporóticos por PIXE na câmara de reações nucleares do LATR-CTN/IST.....	134
Tabela 29) Concentração de zinco em $\mu$ g/g obtidas para quatro ossos osteoporóticos por $\mu$ -XRF no espectrómetro M4 - Tornado da Bruker na FCT/UNL.....	134
Tabela 30) Concentração de estrôncio em $\mu$ g/g obtidas para quatro ossos osteoporóticos por PIXE na câmara de reações nucleares do LATR-CTN/IST.....	136
Tabela 31) Concentração de estrôncio em $\mu$ g/g obtidas para quatro ossos osteoporóticos por $\mu$ -PIXE no espectrómetro M4 - Tornado da Bruker na FCT/UNL.....	136
Tabela 32) Valores da razão Ca/P obtidas para quatro ossos osteoporóticos por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do LATR-CTN/IST. ....	138
Tabela 33) Valores da razão Ca/P obtidas para quatro ossos osteoporóticos por $\mu$ -XRF no espectrómetro M4 - Tornado da Bruker na FCT/UNL. . ....	138
Tabela 34) Valores da concentração de potássio ( $\mu$ g/g) para quatro ossos osteoporóticos por $\mu$ -XRF no espectrómetro M4 - Tornado da Bruker na FCT/UNL. ....	140
Tabela 35) Valores da concentração de chumbo ( $\mu$ g/g) para quatro ossos osteoporóticos por $\mu$ -XRF no espectrómetro M4 - Tornado da Bruker na FCT/UNL. ....	140
Tabela 36) Resultados da análise da secção número 2 do osso osteoporótico 2 por $\mu$ -PIXE na microsonda nuclear no LATR-CTN/IST. As concentrações apresentadas correspondem ao valor médio das análises efetuadas em diferentes áreas da secção sendo as incertezas calculadas com base na dispersão dos dados.....	141
Tabela 37) Resultados da concentração dos elementos e da razão Ca/P para osso pastilhado, obtidos por $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado e por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares. São também apresentados os resultados de $\mu$ -XRF para osso não pastilhado, que correspondem à média dos valores obtidos para as secções números 5 e 6, que foram usadas para fazer a pastilha.....	144
 Tabela C1.1) secção eficaz (mbarn) e secção eficaz diferencial (mbarn/sr) para a reacção $^{31}(p,p'\gamma)^{31}\text{P}$ para a gama de energias 2621 – 3257 keV. ....	160
Tabela C3.1) Resultados da análise por PIXE, na câmara de reações nucleares do CTN/IST, do material de referência padrão Corning Standard B usando um feixe de prótons com 2400 keV de energia.....	178
Tabela C3.2) Resultados da análise por PIXE, na câmara de reações nucleares do CTN/IST, do material de referência padrão Corning Standard D usando um feixe de prótons com 2800 keV de energia.....	178

Tabela C4.1) Resultados da análise da secção número 2 de osso saudável por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	179
Tabela C4.2) Resultados da análise da secção número 8 de osso saudável por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	179
Tabela C4.3) Resultados da análise da secção número 1 do osso com DOP por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	180
Tabela C4.4) Resultados da análise da secção número 2 do osso com DOP por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	180
Tabela C4.5) Resultados da análise da secção número 5 do osso com DOP por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	180
Tabela C4.6) Resultados da análise da secção número 6 do osso com DOP por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	181
Tabela C4.7) Resultados da análise da secção número 10 do osso com DOP por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	181
Tabela C4.8) Resultados da análise da secção número 4 do osso osteoporótico 1 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	181
Tabela C4.9) Resultados da análise da secção número 10 do osso osteoporótico 1 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	182
Tabela C4.10) Resultados da análise da secção número 3 do osso osteoporótico 2 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	182
Tabela C4.11) Resultados da análise da amostra secção número 4 do osso osteoporótico 2 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	182
Tabela C4.12) Resultados da análise da secção número 9 do osso osteoporótico 2 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	183
Tabela C4.13) Resultados da análise da secção número 2 do osso osteoporótico 3 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	183
Tabela C4.14) Resultados da análise da secção número 8 do osso osteoporótico 3 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	183
Tabela C4.15) Resultados da análise da secção número 4 do osso osteoporótico 4 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	184
Tabela C4.16) Resultados da análise da secção número 8 do osso osteoporótico 4 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.....	184



## Lista de Acrónimos

$\omega_x$	Rendimento de fluorescência
$\Gamma_x$	Probabilidade de transição radiativa
$\Gamma_{total}$	Probabilidade de transição total
$\sigma_x$	Secção eficaz de produção de raios-X
$\sigma_A$	Secção eficaz de produção de eletrões de Auger
$S$	Poder de Paragem
$S_e$	Poder de paragem eletrónico
$S_N$	Poder de paragem nuclear
$v$	Velocidade da partícula
$N$	Densidade atómica
$Z$	Número atómico
$m_0$	Massa de repouso do eletrão
$e$	Carga eletrónica
$I$	Potencial de excitação e de ionização médio do alvo
$R$	Alcance
$b_{K\alpha}$	Intensidade relativa da risca $K_\alpha$
$w_K$	Rendimento de fluorescência da camada K
$A_Z$	Massa atómica
$C_Z$	Concentração
$N_{av}$	Número de Avogadro
$T_Z(E)$	Transmissão através da amostra
$\varepsilon_{abs}$	Eficiência absoluta do detetor
$\varepsilon_Z^i$	Eficiência intrínseca
$\Omega$	Ângulo sólido
$t_{K,Z}$	Transmissão através de filtro
$Q$	Carga coletada
$H$	Constante Instrumental
$c$	Velocidade da luz
$I_a$	Corrente das partículas incidentes
$R_b$	Taxa de produção das partículas $b$
$r(\theta, \phi)$	Distribuição angular
$d\Gamma$	Espessura do filme

$\tau$	Secção eficaz total de absorção fotoelétrica
$\sigma_R$	Secção eficaz de Rayleigh
$\sigma_C$	Secção eficaz de Compton
$\mu$	Coeficiente mássico de atenuação
$\mu^*$	Coeficiente mássico de atenuação linear
$K_Z$	Fator de Calibração
$K$	Fator cinemático
PIXE	Emissão de raios-X induzida por partículas carregadas ( <i>Particle Induced X-ray Emission</i> )
PIGE	Emissão de radiação gama emitida por partículas carregadas ( <i>Particle Induced Gamma-ray Emission</i> )
RBS	Espetrometria de Retrodispersão de Rutherford ( <i>Rutherford Backscattering Spectrometry</i> )
EBS	Espetrometria de Retrodispersão Elástica ( <i>Elastic Backscattering Spectrometry</i> )
XRF	Análise por fluorescência de raios-X ( <i>X-Ray Fluorescence analysis</i> )
$K_\alpha$	Radiação característica resultante da transição da camada L para a camada K
$K_{\alpha 1}$	Radiação característica resultante da transição L <sub>III</sub> (2p <sub>3/2</sub> ) para K (1s <sub>1/2</sub> )
$K_{\alpha 2}$	Radiação característica resultante da transição L <sub>II</sub> (2p <sub>1/2</sub> ) para K (1s <sub>1/2</sub> )
$K_\beta$	Radiação característica resultante da transição da camada M para a camada K



# Introdução

---

As doenças ósseas são resultado de uma complexa interação de fatores genéticos, metabolismo, exercício, exposição ambiental e fatores nutricionais. Reconhece-se atualmente que existe uma relação entre composição elementar e patologia do osso. A substituição de um elemento ou ião por um ião com diferentes carga e/ou raio iônico pode conduzir à modificação da estrutura da componente cristalina para além de alterar a sua composição. Para além disso, a deficiência ou o excesso de um dado elemento no osso pode promover a incorporação de elementos tóxicos ou a libertação de elementos essenciais da matriz óssea [1], [2]. A substituição de elevadas concentrações de elementos traço e moléculas na estrutura mineral resulta em defeitos estruturais microscópicos e lacunas, que podem resultar em fratura. Portanto, para avaliação da saúde óssea é importante não só conhecer as concentrações dos elementos maioritários e traço, como perceber se existe uma correlação entre estes elementos, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de biomarcadores mais eficazes da saúde óssea. Nos últimos anos os estudos publicados indicam inclusivamente um interesse especial na razão Ca/P como um possível biomarcador da saúde óssea.

Pensa-se que um aumento da incorporação de metais no osso pode promover a sua fratura por alteração da estrutura mineral e / ou interferência com os processos celulares e resultar em dissolução seletiva da componente mineral do osso que preferencialmente remove cálcio por oposição a outros metais [3]. No caso da osteoporose, os resultados publicados na literatura indicam que existe uma correlação entre esta patologia e deficiências de zinco e de estrôncio e também concentrações mais elevadas de chumbo e cádmio. No caso da doença óssea de Paget, o interesse na composição química do osso e da análise dos elementos traço é ainda maior dado que não se conhece a etiologia da doença nem quais são os fatores que promovem as alterações nos osteoclastos que iniciam o processo patológico, sendo a exposição ambiental uma das hipóteses sugeridas como promotor (*trigger*) da expressão fenotípica da doença dado que esta surge apenas em determinadas regiões de certos países.

As técnicas de análise usando feixes de iões apresentam várias vantagens na análise elementar de amostras biológicas e têm sido aplicadas na análise de amostras ósseas desde a década de 80. As técnicas mais amplamente aplicadas são a análise por ativação neutrónica (NAA, *Neutron Activation Analysis*) [4, 5, 6], a fluorescência de raios-X com radiação de sincrotrão (SRXRF, *Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence*) [7, 8, 9], a emissão de raios-

X induzida por partículas carregadas PIXE, (*Particle Induced X-ray Emission*) [10, 11, 12, 13],  $\mu$ -PIXE [14, 15], a emissão de radiação gama induzida por partículas carregadas (*Particle Induced Gamma-Ray Emission*) [16, 17], entre outras.

Neste trabalho foram aplicadas as técnicas de PIXE,  $\mu$ -PIXE, PIGE e  $\mu$ -XRF para análise de amostras ósseas saudáveis e afetadas com osteoporose e com doença óssea de Paget para quantificação dos elementos majoritários, elementos traço e razão Ca/P. É o primeiro estudo em que são obtidos resultados da composição elementar de osso vivo afetado com doença óssea de Paget dado que, para além de ser uma doença óssea rara, o número de pacientes submetidos a intervenção cirúrgica é muito escasso. É igualmente inovadora a análise simultânea de PIXE e PIGE, com análise dos rendimentos gama para quantificação do fósforo sem recurso a amostras padrão de matriz semelhante ao osso.

Quando se aplicam estas técnicas na análise de amostras ósseas para estudos de possíveis indicadores de diagnóstico, a principal dificuldade está relacionada com o processo de quantificação, até porque estas análises ficam influenciadas pelos efeitos geométricos decorrentes da existência de buracos que caracterizam sobretudo o tecido trabecular. O plano de trabalhos teve como objetivo o estudo de metodologias para uma quantificação fiável dos elementos majoritários e dos elementos traço em amostras ósseas mantendo íntegra a sua estrutura (amostras não pastilhadas).

No primeiro capítulo é feita uma revisão das bases de anatomia e patologias ósseas em que são explicados de forma resumida a microestrutura do osso e os processos de remodelação óssea. São também descritos, para a osteoporose e para a Doença Óssea de Paget, a referida etiologia, epidemiologia, alterações do processo de remodelação óssea e fatores de risco. São apresentadas as funções de alguns elementos majoritários e traço no metabolismo ósseo e a divisão é feita essencialmente em elementos essenciais, provavelmente essenciais e tóxicos. No segundo capítulo é feita uma descrição dos princípios físicos associados às técnicas aplicadas na análise das amostras ósseas e que são fundamentais para a análise dos resultados. A descrição das instalações experimentais do acelerador tandem (CTN/IST), da microsonda nuclear da Oxford Microbeams (CTN/IST) e do espectrómetro M4-Tornado da Bruker (FCT/UNL) é feita no quarto capítulo. No quinto capítulo são apresentados os resultados da medição da secção eficaz da reação de dispersão inelástica do fósforo  $^{31}\text{P}(p, p'\gamma)\text{P}^{31}$  que foi fundamental para quantificação deste elemento por PIGE. No sexto capítulo é apresentado o resultado da análise de uma amostra de osso da anca com osteoporose, em que foi possível analisar osso cortical e osso trabecular. É também apresentado um estudo que incidiu sobre dois procedimentos

distintos de preparação de amostras. Algumas análises preliminares de teste feitas em amostras de osso revelaram que este pode conter gordura decorrente da existência de medula. Como tal, num dos procedimentos testados foram utilizados solventes para remoção desta gordura que pode interferir com as medidas em vácuo. Neste capítulo são tiradas conclusões acerca do solvente escolhido para preparação do conjunto final de amostras. No capítulo sete são apresentados os resultados de PIXE, PIGE e de  $\mu$ -XRF do conjunto final de amostras. São também apresentados os resultados da análise de materiais de referência padrão para validação da aplicação das técnicas para análise das amostras ósseas. No final do capítulo é feita uma discussão acerca da viabilidade das técnicas para análise dos elementos majoritários e traço na análise das amostras ósseas. É feita também uma comparação dos resultados obtidos para o osso saudável e osso com patologia, embora a amostragem utilizada tenha sido reduzida.



# **Bases de Anatomia e Patologias Ósseas**

---

# Microestrutura Óssea

---

O esqueleto humano, composto por 206 ossos, desempenha múltiplas funções vitais que incluem proteção, suporte e sustentação de órgãos internos, mobilidade, hematopoiese e armazenamento de minerais essenciais tais como o cálcio e o fósforo que podem ser armazenados ou libertados de forma controlada de modo a manter constantes as concentrações de iões importantes nos fluidos corporais [18].

O osso é um tecido conjuntivo especializado constituído por uma componente orgânica constituída essencialmente por colagénio tipo I, células e substância osteóide e por uma componente inorgânica que consiste essencialmente em cristais de hidroxiapatite, cuja fórmula química é  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . A hidroxiapatite constitui cerca de um quarto do volume total do osso e 60 a 70% do peso seco de um osso de um ser humano adulto e saudável e representa uma fração de cálcio e de fósforo de cerca de 39.9% e 18.5%, respetivamente, sendo a razão Ca/P (mássica) aproximadamente 2.2 [6, 19]. A hidroxiapatite pode conter impurezas tais como  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{F}^-$ , que podem ser absorvidas pelo cristal e que podem substituir os iões de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{OH}^-$ . Estudos de difração de raios-X mostram justamente que o osso é pouco cristalino devido à incorporação das impurezas mencionadas, nomeadamente, 4-6% de carbonato, 0.9% de sódio e 0.5% de magnésio [3, 20]. A incorporação de moléculas e iões na estrutura da hidroxiapatite pode promover a libertação dos elementos maioritários e elementos traço essenciais e pode ter efeitos diretos no metabolismo ósseo [21, 22]. Mais adiante será abordado em detalhe o efeito de alguns elementos traço no metabolismo ósseo e de que forma estes podem estar associados ao aparecimento de patologias ósseas. O conteúdo relativo de Ca e de P é de grande importância para assegurar a homeostasia mineral e o metabolismo ósseo, sendo a razão Ca/P referida na literatura como um possível biomarcador da saúde óssea [6].

A componente inorgânica contém células especializadas, os osteoblastos que sintetizam os componentes orgânicos da matriz, os osteócitos que são encontrados nas cavidades (lacunas) entre as camadas de matriz óssea e os osteoclastos que são células multi-nucleadas que estão envolvidas na reabsorção e na remodelação do tecido ósseo. Contém ainda outras células que estão em contacto direto com a superfície interior do osso, incluindo monócitos, macrófagos e fibroblastos que modulam as atividades dos osteoblastos e dos osteoclastos [18, 23]. A matriz orgânica é constituída maioritariamente por colagénio tipo I (~95%). Esta molécula é formada por três cadeias peptídicas do tipo  $(\text{GLI-X-Y})_n$ , onde geralmente X é uma prolina e Y uma

hidroxiprolina [24]. A componente orgânica contém ainda substâncias não-colagénicas que incluem fluido extracelular, muco-proteínas, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, osteocalcina, lípidos e pequenos peptídeos, e cerca de 1% de citrato. A componente inorgânica confere dureza/rigidez ao osso enquanto que a componente orgânica é responsável pela sua flexibilidade/resiliência.

É possível distinguir entre dois tipos diferentes de osso, o osso compacto ou cortical e o osso trabecular ou esponjoso. O osso cortical constitui cerca de 80% de todo o tecido ósseo e compreende as camadas concêntricas externas dos ossos do esqueleto apendicular (ossos

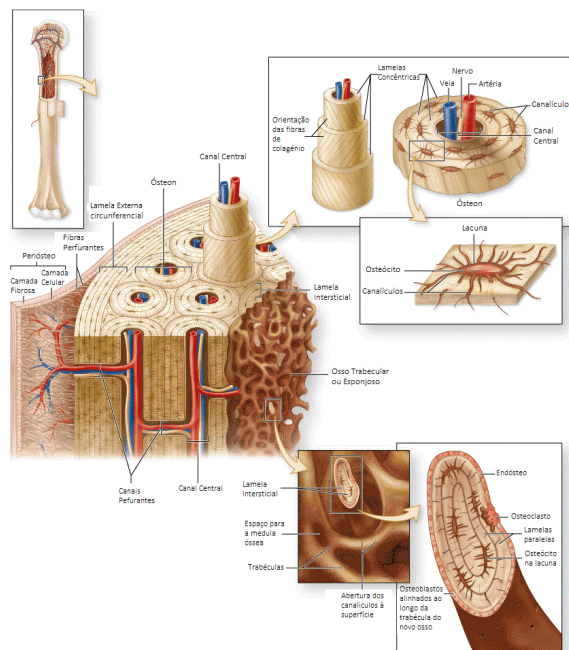


Figura 1) (A) Representação da microestrutura do osso cortical e do osso trabecular; (B) Esquematisação da orientação das fibras de colagénio [18].

longos) e a camada externa fina dos ossos achatados. É constituído por unidades micro-estruturais, os sistemas de *Havers* ou ósteons, que se distribuem de forma circular, à volta do canal de *Havers*. Cada ósteon é formado por várias lamelas intersticiais concêntricas. Transversalmente aos canais de *Havers* distribuem-se os canais de *Volkman*, fundamentais para a vascularização do osso. Entre os sistemas de *Havers*, existe uma camada fina, de matriz não mineralizada, denominada linha cimentada. Estas zonas são fundamentais para manter íntegras as propriedades do osso, na adaptação e resposta a cargas e microtraumatismos (figura 1).

Nalgumas situações patológicas, a espessura e a extensão dessa camada pode aumentar ou diminuir como acontece na doença óssea de Paget [25,26].

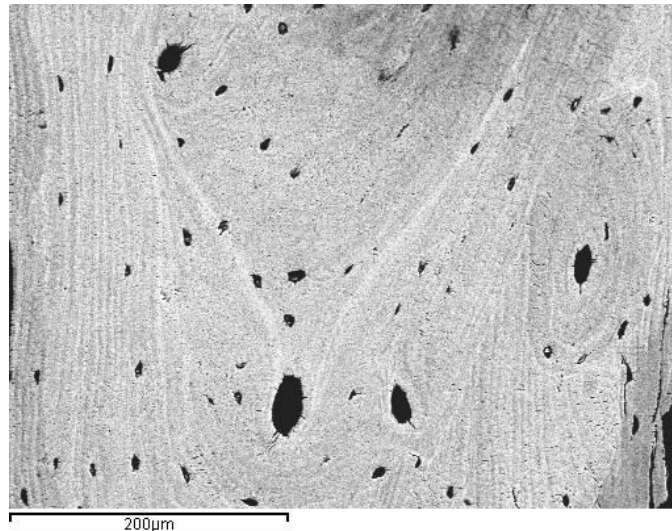


Figura 2) Imagem de uma análise SEM (*Scanning Electron Microscopy*) de uma secção de cabeça do Fémur de gato, onde é possível observar claramente os sistemas de Havers, incluindo as lacunas e localizações dos osteócitos. Esta análise de SEM foi realizada com eletrões retrodispersos (BSE – *Backscattered Electrons*) usando um microscópio da JEOL JSM 7001 F equipado com um espectrómetro EDS da INCA Oxford Instruments [27].

O osso trabecular constitui cerca de 20% da massa óssea total. Compreende as espículas ósseas que ocupam as porções internas dos ossos do esqueleto axial e a porção interna das diáfises dos ossos longos. As unidades microestruturais do osso trabecular ou esponjoso são as trabéculas que se ligam umas às outras formando uma estrutura em rede. A orientação das lamelas no osso trabecular é longitudinal, contrariamente à disposição concêntrica observada no osso cortical. A espessura e a conectividade das trabéculas são variáveis e, entre elas observam-se espaços que tornam o osso esponjoso poroso ao contrário do osso compacto [18, 25].

Neste trabalho as análises vão incidir sobre ossos dos membros inferiores, nomeadamente cabeça do fémur e, para a maioria das amostras, vai ser possível apresentar resultados para o tecido trabecular e também para a cartilagem. A cartilagem é uma forma especializada de tecido conjuntivo em que a consistência firme da matriz extracelular permite que esta suporte cargas mecânicas sem distorção permanente. Para além da matriz extracelular a cartilagem contém células, os condrócitos, que sintetizam e secretam a matriz e que se encontram localizadas nas cavidades da matriz. As principais macromoléculas presentes em todos os tipos de cartilagem são o colagénio, o ácido hialurónico, os proteoglicanos e pequenas quantidades de glicoproteínas. Como consequência dos diferentes requisitos funcionais existem três tipos de cartilagem, a cartilagem hialina, a cartilagem elástica e a fibrocartilagem. Os diferentes tipos



de cartilagem mencionados apresentam diferenças ao nível da composição da sua matriz e a sua distribuição no corpo encontra-se esquematizada na figura 3. A cabeça do fémur é revestida apenas por cartilagem hialina, que é constituída essencialmente por colagénio tipo II [18].

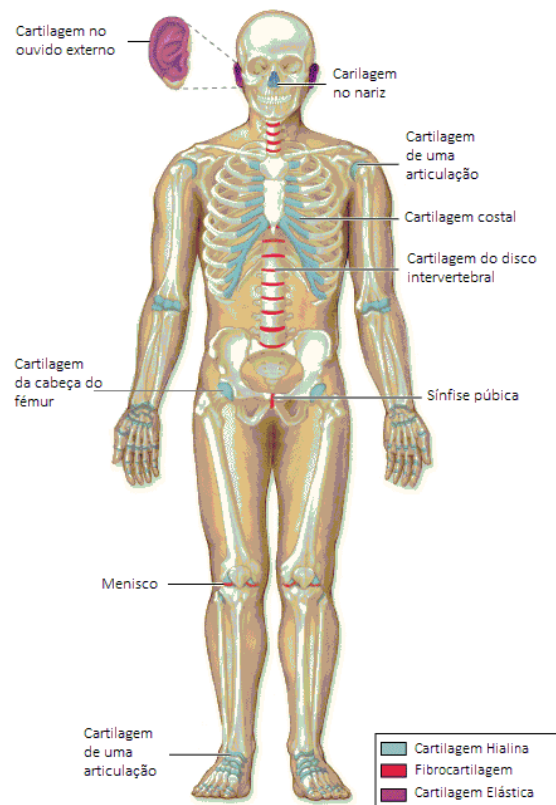


Figura 3) Distribuição dos três tipos de cartilagem, cartilagem hialina, fibrocartilagem e cartilagem elástica no corpo [18].

# **Fisiologia e metabolismo ósseo – remodelação óssea**

---

A remodelação óssea é essencial para a saúde do esqueleto, manutenção do metabolismo do cálcio e do fósforo e para a reparação de microlesões, resulta do equilíbrio entre formação óssea conduzida pelos osteoblastos e reabsorção óssea efetuada pelos osteoclastos, e ocorre durante toda a vida. As cargas e traumatismos provocam microlesões e os ossos têm capacidade para detetar a localização e a extensão da lesão e para remover o osso danificado substituindo-o por tecido novo. Como mencionado, a remodelação óssea tem um papel vital na manutenção da homeostasia do cálcio. Os ossos são o maior reservatório deste elemento, sendo os valores de calcémia rapidamente modificados pela reabsorção óssea ou pela deposição de cálcio nos ossos. O acoplamento dos processos de formação e reabsorção ósseas é fundamental para assegurar a integridade do esqueleto. Em contrapartida, o desacoplamento do ciclo de remodelação pode resultar em perda ou ganho de massa óssea. Após atingido o pico de massa óssea, há uma tendência para o processo de reabsorção prevalecer sobre processo de formação o que conduz a uma perda gradual de osso. A remodelação óssea é um processo cíclico e contínuo que ocorre nas unidades microscópicas do osso e que depende de diversos fatores nomeadamente da formação, proliferação, função e sobrevivência dos osteoclastos, osteoblastos e osteócitos e tem uma duração aproximada de 90 a 130 dias. Inclui três fases diferentes (1) produção de matriz orgânica extracelular ou osteóide, (2) mineralização da matriz com formação de osso e (3) remodelação óssea com reabsorção seguida pela formação de novo osso [23, 25, 26].

# Osteoporose e Doença Óssea de Paget

---

## 1. Osteoporose

O conceito de osteoporose foi sugerido pela primeira vez em 1824 por um cirurgião inglês, *Sir Astley Cooper*, que descreveu a existência de uma relação entre massa óssea reduzida e fraturas na anca em idosos. Contudo o termo em si foi aplicado pela primeira vez por um patologista francês, *Jean Lobstein*, que cunhou o termo em 1835, embora possivelmente se estivesse a referir ao que atualmente é conhecido como osteogénese imperfeita tipo I. A osteoporose relacionada com o envelhecimento ou osteoporose tipo II, foi descrita em 1926 por *Alwens*, que associou a perda óssea à progressão da idade. A osteoporose pós-menopáusicas foi descrita em 1940 por *Fuller Albright* que associou a patologia à diminuição dos estrogénios na pós-menopausa [28]. Em 1990 após um encontro promovido pela organização mundial de saúde (WHO, *World Health Organization*) a osteoporose passou a ser definida como uma síndrome esquelética sistémica caracterizada por perda de massa óssea e microarquitECTURA deteriorada, com aumento da fragilidade óssea e aumento do risco de fratura [29, 30, 31].

A osteoporose é uma doença silenciosa pois durante a sua progressão é assintomática ou sem sintomas apreciáveis. O primeiro sinal da doença pode ser uma fratura súbita e não expectável durante as tarefas do dia-a-dia. Os sintomas surgem assim quando ocorrem fraturas osteoporóticas que são mais frequentes na extremidade distal do rádio, nas vértebras, na anca (colo do fémur e transtrocanterica) e na extremidade proximal do úmero, e incluem dor, especialmente na coluna lombar e cifose dorsal. Afeta principalmente indivíduos idosos e mulheres pós-menopáusicas e tem efeitos severos e debilitantes na qualidade de vida dos pacientes [32, 33].

Classifica-se em osteoporose primária/primitiva ou secundária conforme exista ou não outra doença ou fármaco responsável pela doença. A osteoporose primitiva pode ser tipo I também designada osteoporose pós-menopáusicas pois surge como consequência da menopausa, tipo II também designada osteoporose involutiva quando resulta do envelhecimento e osteoporose idiopática que atinge adultos jovens. A osteoporose secundária resulta de disfunções hormonais, processos inflamatórios, entre outros [34, 35].

## A. Epidemiologia

O aumento da esperança média de vida e do envelhecimento da população em todas as regiões geográficas tem contribuído para uma maior incidência da osteoporose e de fraturas osteoporóticas [36, 37, 38]. Estima-se que uma em cada três mulheres pós-menopáusicas e que um em cada cinco homens com idades superiores a 65 anos terão uma fratura osteoporótica [34]. A osteoporose afeta mais de 75 milhões de indivíduos na Europa, EUA e Japão e mundialmente afeta cerca de 200 milhões de pessoas [39, 40]. Do ponto de vista clínico as fraturas são a complicação mais séria da osteoporose. Baseado em estimativas geográficas a WHO estabeleceu que o número de fraturas do fémur em 2050 vai ser aproximadamente 6.3 milhões. Na União Europeia há quase uma fratura osteoporótica em cada 30 segundos. Após os 60 anos, as fraturas são 2 a 3 vezes mais frequentes nas mulheres do que nos homens [38, 41].

A prevalência da osteoporose aumenta com a idade sendo que um terço das mulheres com idades compreendidas entre os 60 e os 70 anos e dois terços das mulheres com idade superior ou igual a 80 anos têm osteoporose. Afeta também indivíduos de todas as raças embora as mulheres caucasianas e asiáticas sejam o grupo mais afetado [42, 43].

Em Portugal a doença afeta cerca de 5% de toda a população [44]. Um estudo de 1997 envolvendo cerca de 6000 mulheres portuguesas com idades compreendidas entre os 20 e os 89 anos com resultados de absorciometria radiológica de dupla energia (DEXA, *Dual-Energy X-ray Absorptiometry*) do antebraço, concluiu que a prevalência da osteoporose aumenta com a idade e exponencialmente a partir dos 60 anos. Os resultados para a prevalência foram de 5.5% para mulheres com 50 anos e de 50% para mulheres com 80 anos. A prevalência total em mulheres com idades superiores a 50 anos é de 16.7% [37, 45]. Num outro estudo, Jaime Branco et al. registaram uma incidência de osteoporose de 69% em mulheres pós-menopáusicas [46]. A figura 4 mostra a incidência de fraturas osteoporóticas nos distritos de Portugal Continental.

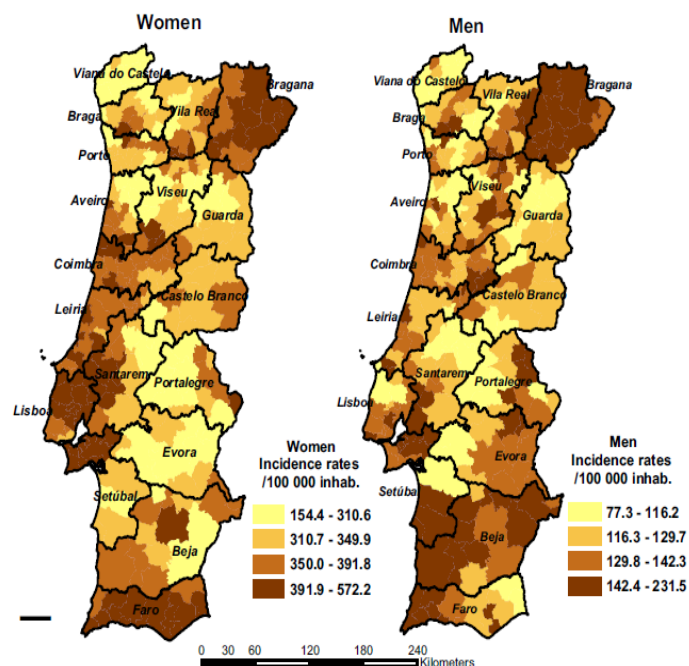


Figura 4) Incidência de fraturas osteoporóticas em homens e mulheres nos distritos de Portugal Continental. Os diferentes tons de castanho mostram as taxas de incidência por cada 100000 habitantes [47].

## B. Alterações na remodelação óssea e nas propriedades estruturais do osso

A osteoporose pode resultar de um defeito no processo de formação óssea ou num desequilíbrio entre os processos de formação e reabsorção ósseas, com predomínio do segundo, sendo este o mecanismo associado à osteoporose pós-menopáusica e à osteoporose secundária à corticoterapia. A supremacia da reabsorção óssea faz com que ocorra diminuição da quantidade de osso. No entanto a diminuição da fase osteoide e da fase mineral ocorrem na mesma proporção [32, 48].

No osso osteoporótico a matriz orgânica extracelular ou osteoide é normal, no entanto, verifica-se um decréscimo da espessura do córtex e do número e tamanho das trabéculas do tecido esponjoso (figura 5) [49]. A remodelação ocorre na superfície do osso, e tendo o osso trabecular uma área de superfície maior e mais locais de remodelação por unidade de volume do que o osso cortical, este tecido é mais afetado. O osso velho, mais distante das superfícies de remodelação é mais mineralizado e acumula progressivamente microlesões que são reparadas, e o osso mais superficial é substituído por novo osso com fraca mineralização. A

maior taxa de remodelação e as cavidades profundas que resultam da reabsorção causam perda de conectividade nas trabéculas o que contribui para uma diminuição da resistência óssea, aumento da incapacidade de absorver energia na sequência de impactos mínimos e maior suscetibilidade à fratura [23, 32, 50]. A conectividade trabecular é um parâmetro importante quando se avalia a força de tensão do osso. A osteoporose é caracterizada por menos força de tensão e maior risco de fratura para uma menor força aplicada. Na OP pós-menopáusia ocorre sobretudo perda de osso trabecular, mas na OP relacionada com o envelhecimento o osso cortical é mais afetado [51].

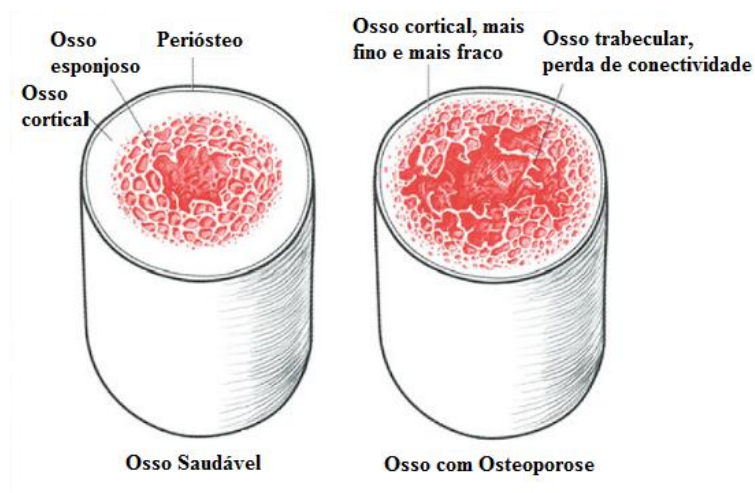


Figura 5) Comparação entre osso trabecular saudável e osso trabecular com osteoporose [52].

### C. Etiologia

A massa óssea de um indivíduo adulto em qualquer fase da vida resulta do balanço entre o pico de massa óssea obtido e o grau de perda óssea ocorrido [53]. Após crescimento completo, a massa óssea atingiu aproximadamente 90% do seu máximo, período após o qual existe um intervalo que é caracterizado por uma taxa de remodelação óssea constante sendo a formação óssea aproximadamente igual à reabsorção óssea. Apesar de o crescimento linear terminar no fim da adolescência, os ossos dos indivíduos adultos continuam a sofrer remodelação e com o envelhecimento a reabsorção óssea acaba por não ser compensada pela formação óssea, sendo a próxima fase caracterizada por uma perda média de massa óssea de aproximadamente 0.3% a 0.5% por ano. Após a menopausa as mulheres têm um período acelerado de perda de massa óssea e em 5-7 anos a massa óssea média perdida é de cerca de 3% a 5% por ano [54].

Embora a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos seja modelada por hormonas sistémicas e citocinas assim como por outros fatores locais como a PTH, a calcitonina e a vitamina D3, a deficiência de estrogénios é um fator significativo no processo de perda acelerada de osso [55, 56, 57]. A deficiência de estrogénios altera os níveis de citocinas específicas na circulação resultando num aumento da reabsorção óssea devido a um maior recrutamento, diferenciação e ativação dos osteoclastos [58]. Embora os níveis de calcitonina nas mulheres sejam inferiores por comparação com os homens, este fator não parece estar relacionado com o desenvolvimento de osteoporose relacionada com o envelhecimento. Como veremos adiante, outros fatores afetam a massa óssea como a atividade física/imobilização, índice de massa corporal, vitamina D e cálcio na dieta, entre outros [32].

Os fatores genéticos são provavelmente os mais importantes quando se avalia o risco de desenvolvimento de osteoporose. Nos últimos anos tem-se verificado um aumento na investigação dos aspetos genéticos da osteoporose e também na determinação de uma boa massa óssea. A osteoporose parece dever-se a vários genes cuja influência dependerá da sua interação com fatores ambientais (como por exemplo, o cálcio na dieta) e do estado hormonal. Após os 40 anos os fatores hormonais e ambientais são mais determinantes na perda de massa óssea, o que é visível pela rápida perda de massa óssea que ocorre nos primeiros anos após a menopausa. Na OP pós-menopáusica a deficiência de estrogénios e na osteoporose relacionada com o envelhecimento a deficiência de cálcio e vitamina D têm efeitos mais determinantes [38, 59, 60, 61]. Têm sido publicados alguns estudos contraditórios sobre a importância dos polimorfismos de alguns genes, como por exemplo dos recetores da vitamina D, estrogénios, recetor sensível ao cálcio, PTH, entre outros. Mais recentemente e com o conhecimento da importância dos mecanismos de controlo da diferenciação dos osteoclastos na fisiopatologia da OP, tem aumentado o interesse no estudo dos polimorfismos do gene TNF alfa [62-66];

#### **D. Fatores de risco**

Os fatores de risco para a osteoporose são divididos em fatores modificáveis que são aqueles que são possíveis ultrapassar por alteração dos hábitos de vida ou por atuação terapêutica e, fatores não modificáveis, que não são controlados pelo paciente. Estes fatores de risco encontram-se resumidos na tabela 1 [66, 67, 68].

<b>NÃO MODIFICÁVEIS</b>	<b>MODIFICÁVEIS</b>
Idade superior a 65 anos (envelhecimento)	Consumo excessivo de álcool
Género (feminino)	Dieta pobre em cálcio
Pequena estatura	Doenças (por exemplo, hipertireoidismo)
Raça (caucásica e asiática)	Fármacos (por exemplo, cortisona)
Hereditárias: História familiar de fratura	Imobilização
Hereditárias: História familiar de osteoporose	Sedentarismo
	Tabagismo
	Magreza Excessiva

Tabela 1) Fatores de risco da osteoporose.

Estes fatores atuam de duas formas principais, contribuindo primeiro para uma baixa massa óssea no momento em que se atinge o pico de massa óssea e depois, para uma perda óssea acelerada. Há três parâmetros que constituem risco de fratura, que são a fragilidade óssea, o risco de queda e o tipo de trauma. Valores baixos de densidade mineral óssea (DMO) são a medida mais fácil de fragilidade óssea e que permitem de certa forma prever a ocorrência de fratura decorrente de osteoporose. Contrariamente aos fatores de risco da osteoporose não é possível enumerar de forma simples uma lista dos fatores de proteção. A identificação dos parâmetros relacionados com uma melhor qualidade óssea, a otimização do balanço entre estrutura, geometria, microarquitetura, massa, composição e função é fundamental porque estes parâmetros podem ajudar a manter uma melhor qualidade óssea com uma massa óssea acima do limiar para fratura. Este conhecimento é, deste modo, importante para o desenvolvimento de terapias capazes de restaurar o balanço da remodelação óssea [69].



## 2. Doença Óssea de Paget

A doença óssea de Paget (DOP), que deve a sua primeira descrição, em 1877, a um médico inglês, Sir James Paget [70], é caracterizada por um distúrbio localizado da remodelação óssea que afeta 2% a 3% dos indivíduos nos EUA com idades superiores a 60 anos [71] e cerca de 3.1% dos indivíduos com idades superiores a 55 anos no Reino Unido [72]. Desconhece-se a percentagem de pessoas afetadas em Portugal, no entanto existe uma percentagem significativa de pessoas afetadas no Alentejo [73]. É uma doença óssea localizada e crónica, caracterizada por um distúrbio da remodelação óssea e arquitetura anormal do osso. Como resultado do aumento da reabsorção óssea e de uma formação óssea também descontrolada, o osso formado é anormal, de maior tamanho, mais denso e mais propenso a fratura [74].

Esta condição pode afetar um osso (forma monostótica) ou vários ossos (forma polióstótica). Na maioria das vezes a doença é assintomática (cerca de 2/3 dos pacientes) [34], sendo normalmente descoberta acidentalmente através do aumento da fosfatase alcalina no sangue ou por um exame de raios-X. A doença pode afetar qualquer osso do esqueleto incidindo principalmente na pélvis e no sacro (mais de 60% dos casos), na coluna vertebral (50%), no fémur e no crânio (40%), na tíbia, no úmero e na clavícula (20%). As mãos, os pés e os ossos da face são raramente afetados. A doença tem tendência para se desenvolver sobretudo ao nível dos membros dominantes, verificando-se que as lesões pagéticas surgem preferencialmente em ossos que suportam grandes cargas mecânicas. As evidências que apoiam esta afirmação surgem da constatação de que a DOP tende a começar nos locais de inserção dos músculos nos ossos. Os sintomas mais comuns são a dor óssea e a deformação. A dor está também associada às deformidades ósseas, como curvatura dos ossos longos, aumento das dimensões do crânio, e aumento da temperatura da pele na zona dos ossos afetados. As fraturas dos ossos longos, a surdez e a compressão radicular e/ou medular constituem os sintomas mais comuns [75, 76]. Existem sintomas raros, mas também relacionados com a DOP que são a insuficiência cardíaca de alto débito e o sarcoma osteogénico. O padrão de envolvimento não se altera ao longo da evolução, ou seja, os ossos atingidos aquando do diagnóstico mantêm-se, não havendo extensão da doença a outras localizações.

## **A. Epidemiologia**

A Doença Óssea de Paget é raramente diagnosticada antes dos 50 anos, mas a sua prevalência tende a duplicar cada década após os 50-55 anos [65], afetando cerca de 8% dos homens e 5% das mulheres no Reino Unido com idade superior ou igual a 80 anos [72]. Existe uma evidente disparidade geográfica na prevalência da doença, sendo mais incidente no Reino Unido, na Europa Ocidental e no sul da Europa e nos emigrantes europeus na Austrália, Nova Zelândia e África do Sul. É pouco comum na Escandinávia e extremamente rara na Índia e no sudeste Asiático, médio oriente e África [76]. Estas diferenças étnicas que caracterizam a incidência da doença sustentam a importância dos fatores genéticos na patogénese. No entanto, os dados existentes sugerem que os fatores ambientais também têm um papel importante no desenvolvimento da doença. As observações clínicas mais recentes sugerem um declínio na prevalência da DOP nos últimos 25 a 30 anos. Este declínio, também verificado ao nível da severidade da doença poderá estar relacionado com alterações ambientais. Há muitas outras potenciais explicações para este decréscimo da incidência e severidade incluindo alterações na nutrição, cargas mecânicas sobre o esqueleto, exposição a infeções, entre outros. A prevalência da DOP é variável dentro de um mesmo país, por exemplo na Grã-Bretanha é mais incidente no Lancashire, nos EUA é mais frequente nos estados do Norte e em Portugal é mais frequente no Alentejo (Estremoz). É mais frequente nos homens do que nas mulheres numa proporção de dois homens para cada mulher [34, 77, 78]. A doença surge preferencialmente no campo por comparação com as áreas urbanas [75].

## **B. Alterações da Remodelação Óssea e propriedades estruturais do osso**

A principal característica das lesões pagéticas são as anormalidades na morfologia e atividade dos osteoclastos. Estas células apresentam maior tamanho, existem em maior número, 10 a 100 vezes superior o normal e são hipernucleadas, com até 100 núcleos por célula por comparação com os osteoclastos normais que têm entre 3 a 5 núcleos [79].

A patogenia é caracterizada por um aumento anárquico da remodelação óssea que é despoletada pelos osteoclastos que escavam múltiplas e profundas camadas de reabsorção na matriz óssea, o que explica o estado inicial osteolítico da doença na maioria dos ossos afetados.

Dado que o acoplamento das funções dos osteoclastos e dos osteoblastos é mantida, ocorre recrutamento de numerosos osteoblastos para os locais de atividade pagética. Como consequência o osso formado é desorganizado, com aspeto de mosaico, com fibras de colagénio dispostas irregularmente e uma medula óssea infiltrada por tecido fibroso e altamente vascularizada. Como consequência, os ossos afetados são mais propensos a deformações em resposta às forças mecânicas aplicadas e sangram mais quando submetidos a cirurgia ou trauma [80, 81].

Os aspetos radiológicos que caracterizam a doença resultam da hiperatividade óssea. As lesões podem ser osteolíticas, osteoblásticas ou apresentarem um aspeto misto de manchas algodonosas que é a situação mais comum no crânio. Na forma polióstótica podem ser detetados os vários estágios da doença em diferentes regiões do esqueleto [34, 75]

### **C. Etiologia**

Atualmente a etiologia da DOP ainda não é conhecida embora as evidências sugiram uma combinação entre uma componente genética e fatores ambientais. Uma das hipóteses sugeridas e amplamente estudada é a hipótese viral, um processo de infeção lenta dos osteoclastos com um paramixovírus e, em estudos de microscopia eletrónica, foi possível encontrar nucleocapsídeos nos núcleos e no citoplasma de osteoclastos pagéticos. Estudos posteriores confirmaram que estas inclusões reagem com anticorpos contra o vírus do sarampo e o vírus sincicial respiratório. O vírus da cinomose ou esgana canina também foi identificado. Esta hipótese viral é controversa pois apresenta resultados positivos em alguns estudos e resultados negativos noutros. Outros fatores ambientais, como o cálcio na dieta e a exposição a toxinas ambientais, têm também sido implicados na etiologia da DOP [82-86].

Os fatores genéticos desempenham um papel importante na doença e 15 a 40% dos indivíduos tem uma história positiva da doença na família. Na DOP e síndromes relacionados, estão identificadas mutações em três genes, o RANK, a osteoprotegerina, e o sequestossoma 1. A agregação familiar é verificada e a doença pode ser transmitida verticalmente através de gerações numa família afetada. Os resultados de um estudo recente indicam que pacientes com uma história familiar positiva apresentam sintomas da doença mais cedo e uma maior taxa de fratura [87, 88, 89].

Os resultados até agora sugerem que é difícil encontrar uma base genética e ambiental etiológica exclusiva para a DOP. A hipótese mais plausível parece ser uma combinação de fatores ambientais que atuam localmente e sistemicamente e vão modificar o risco em indivíduos geneticamente predispostos e que a manifestação fenotípica da doença pode resultar de uma variedade de caminhos fisiopatológicos. Tanto a hipótese genética como a viral não respondem à questão por que é que a DOP é focal. Dado que uma publicação recente revelou a presença de elevadas concentrações de chumbo em ossos afetados com DOP [81] e, conhecidos os efeitos tóxicos que este elemento exerce ao nível dos osteoblastos e dos osteoclastos, especial interesse foi atribuído a este elemento aquando da análise das amostras ósseas neste trabalho.

# **Elementos Maioritários e Elementos Traço e sua Função no Metabolismo e Saúde Ósseos**

---

Até à data estão descritos trinta elementos que influenciam o metabolismo e a saúde ósseos, a osteogénese e a homeostasia, identificados na figura 6. Os elementos essenciais que são fundamentais para o crescimento, desenvolvimento e manutenção de ossos quaisquer que sejam as suas concentrações no organismo são o cálcio, o fósforo, o potássio, o magnésio, o silício e o zinco. Os elementos que têm funções essenciais, mas que também podem ser tóxicos, são o arsénio, o cobalto, o crómio, o cobre, o ferro, o manganésio, o molibdénio, o selénio e o vanádio. O boro e o ouro são elementos não essenciais, mas benéficos e que não apresentam efeitos tóxicos. O flúor não é um elemento essencial embora apresente um efeito possivelmente benéfico, podendo apresentar em certas condições efeitos tóxicos. O gálio embora não seja um elemento essencial apresenta efeitos benéficos e não existem provas de que seja tóxico quando presente em doses farmacológicas. O sódio é um elemento essencial, estando descritos efeitos perniciosos associados a concentrações elevadas deste elemento. Não existem evidências de que o estrôncio seja um elemento essencial, mas estudos recentes têm revelado que este elemento é potencialmente benéfico, sendo-lhe também reconhecidos efeitos tóxicos. O lítio e a platina são elementos não essenciais e potencialmente benéficos e tóxicos. Os elementos que apresentam apenas efeitos tóxicos são o alumínio, o cádmio, o chumbo, o mercúrio e o urânio [90].

Como mencionado anteriormente, o objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento de metodologias para medição correta da concentração de dois elementos maioritários da componente inorgânica, o cálcio e o fósforo, e para aceder de forma precisa à razão Ca/P, tentando perceber se existem alterações nestes valores em ossos com patologia por comparação com o osso saudável. Pretende-se também verificar possíveis alterações ao nível de outros elementos traço, nomeadamente o zinco, o estrôncio, o ferro, com especial interesse nos elementos tóxicos, em particular o chumbo, dado que resultados recentes reportam a presença de chumbo em ossos com doença óssea de Paget [91]. Por esse motivo vou focar sobretudo nas funções destes elementos e abordar de que forma estes podem influenciar o metabolismo e saúdes ósseas. Vou também falar mais pormenorizadamente sobre o flúor, dado que este elemento já foi usado no tratamento da osteoporose, o silício, o cobre, o crómio e o manganésio



## 1. Elementos maioritários da matriz mineral do osso

Os elementos maioritários na matriz inorgânica são o cálcio, o fósforo, o sódio e o potássio. O cálcio desempenha uma função estrutural essencial no osso. É o quinto elemento mais abundante no corpo humano, existindo aproximadamente 1000 g nos indivíduos adultos. A grande maioria do cálcio no organismo (mais de 99%) existe na forma de fosfatos de cálcio, essencialmente hidroxiapatite, sendo parcialmente libertado na corrente sanguínea devido ao processo de reabsorção óssea. Os restantes 1% encontram-se nos fluidos intra- e extra-celulares. A quantidade total de cálcio e de fósforo no organismo é mantida por um complexo sistema regulatório. As principais hormonas envolvidas são a paratormona (PTH) e a vitamina D. Estas hormonas atuam em três órgãos alvo, o intestino, regulando a reabsorção de cálcio, o rim, regulando a excreção de cálcio e fósforo e o osso, regulando a taxa de reabsorção e formação ósseas [93, 94].

Uma dieta pobre em cálcio tem como consequência uma redução do conteúdo mineral e da densidade mineral do osso, e uma deficiência deste elemento a longo prazo pode ter consequências mais graves na saúde óssea podendo resultar em condições de raquitismo, osteomalácia e osteoporose. Por outro lado, um elevado consumo de cálcio, através da comida ou de suplementos, contribui para uma melhor homeostasia de cálcio, melhora a mineralização óssea durante o crescimento, e resulta num decréscimo da perda de osso contribuindo para uma redução do risco de fratura osteoporótica em indivíduos de idade avançada. Experiências *in vitro* com culturas celulares mostraram que o cálcio também influencia o metabolismo ósseo, dado que elevadas concentrações de cálcio extracelular estimulam a formação de células precursoras dos osteoclastos e a reabsorção óssea por osteoclastos maduros e também a síntese de ADN em osteoblastos. Embora a principal função do cálcio no metabolismo ósseo seja na constituição da hidroxiapatite, este elemento apresenta múltiplas e complexas funções reguladoras. Uma compreensão completa do papel do cálcio no metabolismo ósseo requer uma visão global dos diferentes mecanismos de ação o que até à data ainda não foi possível [92]. Para além das suas funções essenciais na mineralização do esqueleto, este elemento é fundamental para assegurar uma variada gama de funções biológicas que incluem participação na coagulação do sangue, atuação na contração muscular, atuação na permeabilidade da membrana, condução nervosa, secreção do leite e estrutura da casca do ovo nas aves.

O fósforo é um importante componente dos tecidos moles e de várias estruturas celulares. Está presente nos fluidos intra- e extra- celulares e participa, direta ou indiretamente, na maioria

dos processos metabólicos. Existe no organismo sob a forma de fosfato mineral ( $\approx 85\%$ ) e de fosfato orgânico ( $\approx 15\%$ ). Na forma de íons fosfato da estrutura da hidroxiapatite é um componente estrutural dos ossos. Embora sejam raros os casos de deficiência deste elemento em seres humanos, alguns casos isolados revelaram que pode provocar, raquitismo e osteomalacia [91]. Muitos estudos têm indicado também efeitos adversos de dietas com elevados níveis de fósforo, incluindo redução da formação óssea com um aumento da reabsorção óssea e deterioração das propriedades biomecânicas. Contudo, estes efeitos adversos são contestados por experiências *in vitro* que reportam a inibição da diferenciação dos osteoclastos e da sua atividade. Um outro estudo envolvendo uma meta-análise permitiu concluir que o consumo de maiores doses de fosfato estava relacionado com um decréscimo de cálcio na urina e um aumento da retenção de cálcio, não tendo sido encontradas evidências de que o consumo de maiores doses de fosfato resulte em desmineralização do osso [94]. Estes resultados sugerem, no entanto, que os metabolismos do fósforo e do cálcio estão intimamente ligados e que não devem ser considerados separadamente [95].

O cálcio e o fosfato interagem em muitos processos fundamentais no organismo devido a fatores hormonais e físico-químicos. O conteúdo relativo de cálcio e fósforo é crítico para manutenção da homeostasia mineral e metabolismo ósseo e a sua co-dependência é evidente para o crescimento e desenvolvimento ósseos sendo que a razão Ca/P tem sido sugerida na literatura como um possível biomarcador da saúde óssea e constitui uma parte importante das análises do presente trabalho [96].



## **2. Influência dos elementos traço no metabolismo ósseo**

O osso é o principal reservatório para alguns elementos traço, elementos cujas concentrações são da ordem dos microgramas por grama ou menos, e que são fundamentais para a manutenção das funções fisiológicas normais relacionadas com o crescimento e com o desenvolvimento do corpo. De acordo com o seu efeito biológico dividem-se em essenciais, provavelmente essenciais e não essenciais [97, 98].

Os elementos traço embora presentes em quantidades diminutas podem influenciar de forma considerável os processos metabólicos, sendo este efeito agravado através da interação ou da incorporação em proteínas, nomeadamente as enzimas. Existem elementos traço que desempenham funções essenciais no organismo, mas que acima de determinadas concentrações adquirem efeitos tóxicos, como é o caso do flúor. Os efeitos tóxicos de um elemento traço podem envolver a inibição de uma enzima por ligação ao lado ativo ou interações competitivas com minerais principais [2]. A literatura mostra que têm sido direcionados vários esforços para o estudo da composição elementar do osso e para tentar perceber de que forma os elementos traço podem afetar o metabolismo ósseo. Os resultados destes estudos permitiram o agrupamento dos elementos de acordo com o seu efeito e a constatação de que alterações das concentrações nos tecidos e fluidos corporais podem ser acompanhadas de alterações patológicas [22, 98].

### **A. Elementos traço essenciais**

- **Zinco**

O zinco é um dos elementos traço mais abundantes. Atua no organismo essencialmente como co-fator de algumas centenas de enzimas dependentes de zinco tais como a DNA polimerase e a fosfatase alcalina. Estas enzimas regulam o crescimento ósseo, o sistema imunitário, o crescimento celular, a síntese de colagénio, a cicatrização de feridas, o metabolismo ósseo, a reprodução, o paladar, o olfato e a visão. O conteúdo de zinco no organismo é de aproximadamente 2.5 g, dos quais 30% encontram-se nos ossos [99]. Este elemento é essencial para o crescimento humano e animal e no desenvolvimento e manutenção

de ossos saudáveis. Nos ossos está concentrado na camada osteoide antes da sua calcificação tendo um papel fundamental na homeostasia óssea por modulação da atividade dos osteoclastos e dos osteoblastos, contribuindo para um aumento da massa óssea [100, 101]. Diversos estudos *in vivo* e observações clínicas confirmam que uma deficiência em zinco conduz a uma retardação do crescimento ósseo, várias anormalidades esqueléticas e osteopénia [91]. Os dados existentes sugerem que a acumulação de zinco no tecido ósseo promove a ativação da fosfatase alcalina e a síntese de colagénio pelos osteoblastos [102]. Os resultados de estudos clínicos sugerem que pacientes com osteoporose apresentam concentrações de zinco mais baixas do que indivíduos saudáveis. Estes estudos mostraram também que a determinação do zinco excretado na urina pode ser útil como um método bioquímico e para poder observar um efeito clínico de determinadas terapias [98, 103]. Uma ingestão inadequada de zinco e uma reduzida concentração deste elemento no sangue pode estar associado ao desenvolvimento de osteoporose. A informação existente na literatura permite concluir que o zinco é o fator nutricional que mais afeta o metabolismo e a toxicidade dos metais pesados incluindo o chumbo e o cádmio [104]. Um reforço no consumo de zinco na dieta pode reduzir o risco de fraturas ósseas para indivíduos expostos a cádmio melhorando as propriedades biomecânicas do tecido ósseo, como é possível ver na figura 7 [105].

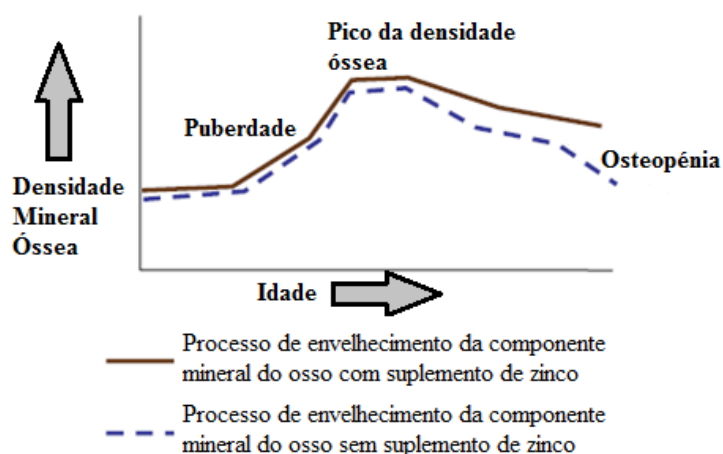


Figura 7) Modelo esquemático da relação entre o zinco e a densidade mineral óssea. O gráfico mostra o decréscimo da massa mineral do osso com a idade e o efeito do zinco no osso com o avanço da idade [105].

- **Silício**

O silício desempenha funções essenciais na formação e saúde ósseas. Este elemento estimula a proliferação dos osteoblastos, a síntese da matriz extracelular, a atividade da fosfatase alcalina e a síntese de osteocalcina e do colagénio tipo I. Contudo a função deste elemento na reabsorção óssea e na atividade dos osteoclastos ainda não está totalmente compreendida. Alguns estudos publicados na literatura sugerem que há uma associação positiva entre a ingestão deste elemento e os valores de densidade mineral óssea e com os níveis de estrogénio [106-110].

## **B. Elementos traço essenciais e potencialmente tóxicos**

- **Estrôncio**

Não existem dados suficientes para provar que este elemento é essencial, mas sabe-se que tem uma ação potencialmente benéfica podendo contudo apresentar efeitos tóxicos. Substitui vulgarmente o cálcio durante a formação do tecido ósseo e nas funções fisiológicas e processos homeostáticos incluindo ligação durante o transporte de proteínas na linfa e no plasma. Este elemento permuta com o cálcio por absorção nas superfícies da estrutura cristalina e por substituição iónica na estrutura cristalina da hidroxiapatite. Pequenas doses de estrôncio ( $\approx 150$  ppm) promovem um aumento da taxa de formação, da densidade e da taxa de aposição óssea, e reduzem a taxa de reabsorção óssea. Têm sido aplicadas baixas doses de estrôncio, na forma de ranelato de estrôncio, no tratamento da osteoporose e na redução da taxa de fratura osteoporótica. Este medicamento promove o aumento da massa óssea, melhora a microarquitECTURA óssea e aumenta o número de trabéculas, diminuindo o espaçamento entre trabéculas e inibindo a reabsorção óssea. Ossos com baixas concentrações de estrôncio são mais propensos a fratura. Nomeadamente, alguns estudos indicam uma correlação entre baixas concentrações de estrôncio e a incidência de osteoporose. Os efeitos negativos incluem entre outros, lesões características da osteomalácia exibidas por animais com falência renal crónica [91, 111].

- **Flúor**

Os efeitos do flúor permanecem controversos pois, embora esteja determinada a ação benéfica deste elemento nas cáries dentárias, a forma como influencia o metabolismo ósseo ainda não está claramente definida. Os efeitos dependentes da dose de flúor nas células ósseas e nas propriedades estruturais do osso estão claramente definidos, e estudos recentes reforçaram os efeitos benéficos da administração de baixas doses, no entanto a aplicação deste elemento no tratamento da osteoporose tem sido questionado e foi descontinuado. Os efeitos benéficos a baixas doses incluem o estímulo da proliferação dos pré-osteoblastos com consequente aumento do número de osteoblastos sem interferir na reabsorção óssea e o aumento da taxa de aposição mineral óssea e da densidade trabecular sem produção de defeitos minerais detetáveis. No entanto, elevadas doses de flúor podem alterar a mineralização óssea e produzir defeitos na estrutura cristalina por substituição do grupo hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ). A toxicidade devido a um excesso de flúor pode resultar em fluorose óssea, distúrbio da homeostasia que se traduz num decréscimo da massa óssea. Doses relativamente elevadas contribuem para um aumento da densidade mineral óssea, do volume ósseo, da espessura das trabéculas e da formação de novo tecido trabecular e cortical. No entanto o novo osso formado na presença de excesso de flúor exibe características anormais da matriz com um enfraquecimento das suas propriedades biomecânicas [91, 112, 113, 114]

- **Ferro**

É um dos elementos traço mais importantes. O conteúdo deste elemento no organismo é de 4-6 g e encontra-se nas seguintes formas, hemoglobina (68%), ferritina (13%), hemossiderina (12%), mioglobina (3%), enzimas (0.2%) e outros compostos de ferro (3.6%). Uma deficiência nutricional em ferro afeta a homeostasia óssea, a formação e a reabsorção ósseas tendo como consequência uma redução da densidade e da massa mineral, alterações na microestrutura e redução da força do osso. Contudo, níveis elevados de ferro podem estar na origem de diferentes tipos de osteoporose, aumento da reabsorção óssea e aumento do risco de fratura [91, 98].

- **Cobre, Crómio e Manganésio**

O cobre é o terceiro elemento traço mais abundante no corpo humano. No plasma 90% está ligado a uma metaloenzima conjugada, a ceruplasmina, 9% está ligada a proteínas de transporte, como a albumina, e apenas 1% encontra-se sob a forma de iões livres,  $\text{Cu}^{2+}$ . Este elemento tem várias funções fisiológicas vitais, como eritropoiese, produção de energia nas células, condução nervosa, metabolismo do estrogénio, estímulo da produção de neurotransmissores e catalisador para enzimas que contêm cobre tais como a ceruloplasmina. Estudos realizados mostram que uma deficiência em cobre no organismo promove inibição do crescimento ósseo, mineralização óssea reduzida e alterações patológicas características da osteoporose [98].

O manganésio é co-fator de numerosas enzimas, desempenhando várias funções vitais no organismo. É um elemento essencial para o crescimento ósseo e uma deficiência deste elemento está associada a um desenvolvimento anormal do esqueleto em seres humanos e animais, defeitos na condrogénese, osteogénese e reabsorção óssea debilitadas. Quando em excesso promove um debilitado desenvolvimento ósseo e neurotoxicidade [91-98].

O crómio, na forma de ião trivalente é um elemento traço essencial que desempenha numerosas funções no metabolismo dos lípidos e carboidratos. Na forma de ião  $\text{Cr}^{6+}$  é tóxico e contribui para uma reduzida ossificação. Contribui também para uma acelerada reabsorção óssea e reduzida formação óssea. A associação cobalto-crómio tem também ações perniciosas como a indução da apoptose dos osteoclastos [91, 97, 115].

## **C. Elementos Traço Tóxicos**

- **Cádmio**

Devido à sua elevada toxicidade e fortes propriedades cumulativas no organismo e no ambiente, o cádmio tem sido identificado como um dos elementos mais tóxicos. É um poluente químico típico dos países desenvolvidos. A população fica exposta a este elemento através de comida contaminada, água não filtrada e fumo de tabaco. A sua toxicidade está relacionada com a forma como este elemento influencia os sistemas celulares enzimáticos, pois substitui outros iões como o zinco, o cobre e o cálcio nas metaloenzimas e tem elevada afinidade para as

estruturas biológicas que contêm grupos –SH (proteínas, enzimas e ácidos nucleicos). Uma exposição agravada a este elemento pode promover danos sobretudo ao nível dos rins e do esqueleto. As consequências mais graves incluem osteoporose e osteomalácia e uma maior prevalência de fraturas. A doença de *Itai-Itai* foi registada pela primeira vez no Japão, em 1986, e é caracterizada por danos severos nos rins e nos ossos, com sintomas agravados de osteoporose e osteomalácia. Deveu-se a uma contaminação severa com cádmio, da população de uma dada região, através da utilização de água, contaminada por desperdícios de minas, para irrigação de campos de arroz. Este elemento pode afetar a saúde óssea de forma direta atuando ao nível das células ósseas, ou de forma indireta atuando ao nível dos rins e do trato gastrointestinal. Os resultados de estudos recentes mostram que níveis de 400 ng/g de cádmio na dieta reduzem significativamente a produção de vitamina D, que é essencial para o desenvolvimento ósseo. Consumos dietéticos de apenas 250 ng/g diminuem a massa e a força ósseas, sugerindo que por mais baixas que sejam as concentrações de cádmio este elemento tem sempre efeitos negativos ao nível do sistema ósseo [116, 117, 118].

- **Chumbo**

Ocorre no organismo na forma de ião divalente e pode substituir o ião  $\text{Ca}^{2+}$  em processos biológicos tais como formação de tecido ósseo. Este elemento pode inclusivamente substituir o cálcio na matriz da hidroxiapatite e tem maior afinidade para a osteocalcina do que o cálcio. O tecido ósseo retém cerca de 95% do total do chumbo no organismo (meia-vida de aproximadamente 27 anos), mas contrariamente ao estrôncio e ao flúor, este elemento não tem efeitos benéficos para a saúde a baixas concentrações e é tóxico para concentrações moderadas a elevadas. Tem efeitos tóxicos no sistema nervoso central e periférico e tem vários efeitos negativos ao nível da formação óssea. Nomeadamente, a incorporação de chumbo no osso altera o metabolismo dos osteoclastos e dos osteoblastos, diminui a produção de células estaminais dos osteoblastos, perturba a homeostasia do cálcio, limita os fatores de crescimento essenciais e altera o processo de remodelação e a sinalização da maturação óssea [118, 119, 120].

# **Bases Físicas das Técnicas Aplicadas para Análise Elementar do Osso**

---

## Estudos da composição elementar do osso

---

A aplicação da radiação ao estudo de amostras ósseas data de 1930, com a aplicação de raios-X à análise de ossos e dentes para estudo da componente inorgânica e da estrutura cristalina [121]. O desenvolvimento dos aceleradores de partículas, e posteriormente, na década de 60, o aparecimento dos primeiros detetores de Si(Li) com uma resolução em energia de cerca de 150 eV, despoletou o interesse na aplicação de técnicas de feixe de iões a várias áreas como geologia, arqueologia, biologia, entre outros. O primeiro estudo publicado sobre a análise elementar de amostras ósseas data de 1960, com a aplicação de processos histoquímicos para análise de zinco em locais de calcificação [122]. Até à década de 80 a maioria dos estudos da composição elementar do osso eram de facto feitos com recurso a análises químicas, baseadas em métodos destrutivos, em que a informação acerca da distribuição espacial dos elementos dentro dos tecidos era normalmente perdida. Com o interesse crescente na composição elementar do osso e no estudo de doenças ósseas, várias têm sido as técnicas analíticas aplicadas à análise de ossos, nomeadamente análise por ativação neutrónica (NAA) [4, 5, 6], fluorescência de raios-X com radiação de sincrotrão (SRXRF) [7, 8, 9], emissão de raios-X induzida por partículas carregadas (PIXE) [10-14],  $\mu$ -PIXE [15, 16], emissão de radiação gama induzida por partículas carregadas (PIGE) [17, 18], entre outras. Especial interesse tem sido demonstrado no estudo da razão Ca/P, e os resultados da aplicação destas técnicas sugerem que os valores da razão Ca/P estão possivelmente relacionados com a perda de massa óssea induzida e que pode influenciar a qualidade do osso. Os resultados publicados sugerem também que a razão Ca/P não é dependente do género e da idade [96, 123]. Para além da razão Ca/P, os elementos traço essenciais e os potencialmente tóxicos ou tóxicos, também são importantes indicadores da saúde óssea. As técnicas de análise atuais permitem um estudo da concentração dos elementos dentro do tecido ósseo e da forma como estes elementos se distribuem dentro do osso. De seguida serão abordados alguns aspetos teóricos associados a cada uma das técnicas aplicadas na análise das amostras ósseas neste trabalho, PIXE, PIGE e  $\mu$ -XRF, e que são fundamentais na análise dos resultados e no estabelecimento de condições mais apropriadas para uma análise mais eficiente das amostras ósseas e para poder retirar a máxima informação acerca dos elementos maioritários e dos elementos traço.



# 1. PIXE - Emissão de Raios-X Induzida por Partículas Carregadas

A técnica de PIXE assenta no princípio físico de produção e emissão de raios-X quando um elemento é bombardeado com partículas carregadas. Embora o acrónimo considere que a produção de raios-X se deve a quaisquer partículas carregadas, a verdade é que o projétil mais utilizado é o protão. Isto deve-se ao facto de a secção eficaz para a produção de raios-X ser maior para protões do que para qualquer outra partícula mais pesada e, por outro lado, os parâmetros físicos relativos a protões serem melhor conhecidos [124]. Esta técnica permite a identificação e quantificação de elementos com número atómico superior a 11 com limite de detecção na ordem dos  $\mu\text{g/g}$  (ppm) no caso de filmes finos e precisão absoluta de 5 a 30% [125]. Apresenta como vantagem a simplicidade de todos os elementos aparecerem no espectro de forma monoatómica e previsível, enquanto que no caso da técnica de PIGE, como veremos adiante, as reações nucleares mudam radicalmente de um elemento para outro. Por comparação com outras técnicas como a Espectroscopia de Retrodispersão de Rutherford (RBS, *Rutherford Backscattering Spectroscopy*) e a análise por reações nucleares (NRA, *Nuclear Reaction Analysis*), não dá informação sobre o perfil em profundidade de um dado elemento no alvo. A maioria da atividade de PIXE está concentrada em laboratórios de física nuclear. Cahill *et al.* listaram 127 grupos de PIXE em 35 países diferentes dos quais 110 – 115 constituem programas ativos [126].

## A. Princípio Físico da Técnica de PIXE

Nas análises por PIXE são normalmente usados feixes de protões, embora outras partículas possam ser utilizadas. No presente trabalho, as análises foram feitas com feixe de  $\text{H}^+$  com energias compreendidas entre os 1 – 4 MeV. A técnica baseia-se essencialmente na ejeção de eletrões das camadas internas dos átomos quando bombardeados com um feixe de partículas e, espectroscopia dos raios-X emitidos.

O bombardeamento da amostra com partículas com estas energias provoca a ionização das camadas mais interiores do átomo com formação de lacuna. O átomo, num instante de tempo extremamente curto ( $\sim 10^{-15}$  s), regressa ao estado fundamental por transição dos eletrões

das camadas mais exteriores para as camadas mais interiores. Uma transição entre dois níveis de energia pode ser acompanhada da emissão de um fóton característico de frequência igual à diferença de energia dos dois níveis a dividir pela constante de *Planck* – **transição radiativa**. Alternativamente, pode ocorrer transferência de energia para um elétron de outra camada atômica provocando a ejeção do mesmo que se designa elétron de Auger – **transição não radiativa ou de Auger**. As transições não radiativas resultam num átomo com duas ou mais lacunas [127]. Estes dois processos de decaimento são competitivos, embora a probabilidade de decaimento na forma de transições não radiativas seja mais frequente para átomos com número atômico inferior a 30. Para átomos com número atômico superior a 30 as transições radiativas têm maior probabilidade de ocorrer (figura 8).

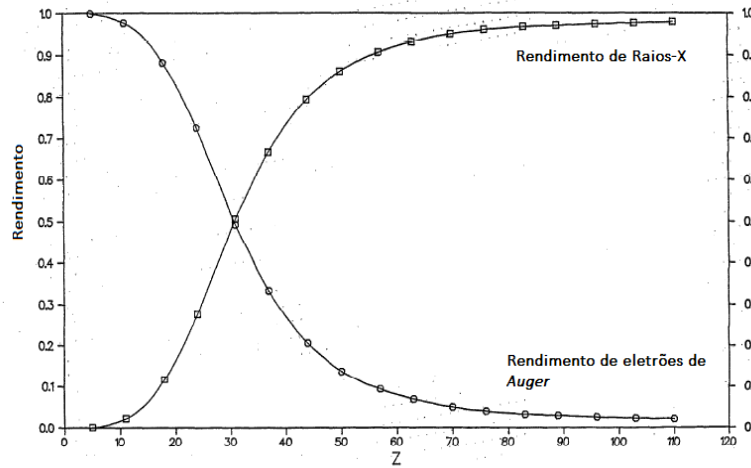


Figura 8) Rendimento da emissão de raios-X e rendimento da emissão de elétrons de Auger em função do número atômico dos elementos, Z [128].

A probabilidade do processo radiativo denomina-se rendimento de fluorescência e constitui um dos aspetos mais importantes na determinação da intensidade de um pico e na quantificação de um determinado elemento na amostra. Para cada estado excitado de um átomo isolado, o rendimento de fluorescência é definido em função das probabilidades de transição radiativa e total para esse estado em particular,

$$\omega_x = \Gamma_x / \Gamma_{total} \quad 2.1$$

O rendimento de fluorescência médio é também determinado a partir das secções eficazes de produção de raios-X ( $\sigma_x$ ) e de produção de elétrons de Auger ( $\sigma_A$ ),

$$\omega_x^{av} = \frac{\sigma_x}{\sigma_x + \sigma_A} \quad 2.2$$

Alternativamente é possível representar esta grandeza como um quociente entre o número de fótons emitidos e o número de lacunas formadas por unidade de tempo,

$$\omega_K = \frac{nK_{\alpha 1} + nK_{\alpha 2} + nK_{\beta} + \dots}{N_K} \quad 2.3$$

Para as camadas L e M que compreendem 3 e 5 subcamadas, respetivamente, se são produzidos  $N$  estados excitados com distribuição  $n_i$  cada um com rendimento de fluorescência  $\omega_x^i$ , então o rendimento de fluorescência médio é dado por,

$$\omega_x^{av} = N^{-1} \sum_i n_i \omega_x^i \quad 2.4$$

O rendimento de fluorescência aumenta com o número atómico e difere significativamente de uma camada eletrónica para outra, por exemplo,  $\omega_K$  é muito maior do que  $\omega_L$ . O rendimento de fluorescência é perto de 100% para elementos pesados e de apenas alguns por cento para elementos leves.

## B. Espectro de raios-X

Os raios-X emitidos no processo de desexcitação do átomo constituem a radiação característica e surgem no espectro na forma de picos discretos. Nem todas as transições entre níveis são permitidas. Só existem transições entre níveis de energia cujos números quânticos satisfazem às regras da seleção:

$$\Delta n \geq 1, \quad \Delta l = \pm 1, \quad \Delta j = 0; \pm 1$$

Os picos da radiação característica estão sobrepostos num fundo contínuo que se deve ao processo de *bremsstrahlung* e que constitui o principal fator determinante do limite de deteção da técnica para alguns elementos. A radiação de fundo contínua tem várias contribuições, sendo a do projétil mínima. As restantes contribuições resultam do *bremsstrahlung* dos eletrões secundários, a componente predominante, *bremsstrahlung* dos eletrões quase livres e do *bremsstrahlung* atómico, muito menos intenso do que o dos eletrões secundários, mas que se estende a energias mais elevadas. A descrição matemática desta radiação de fundo é bastante complexa, até porque para além das contribuições descritas, a dispersão de *Compton* da radiação gama, proveniente das reações nucleares, também vai influenciar a forma da radiação de fundo. A figura 9 mostra um espectro de raios-X resultante da análise de osso de gato por  $\mu$ -PIXE na microsonda nuclear instalada no LATR-CTN/IST, com um feixe de  $H^+$  com energia

2 MeV. É possível ver claramente as riscas  $K_\alpha$  e  $K_\beta$  do cálcio e do zinco. No gráfico surgem também os picos soma do cálcio e do fósforo, conforme indicados na figura 9, cuja definição será apresentada mais adiante neste subcapítulo.

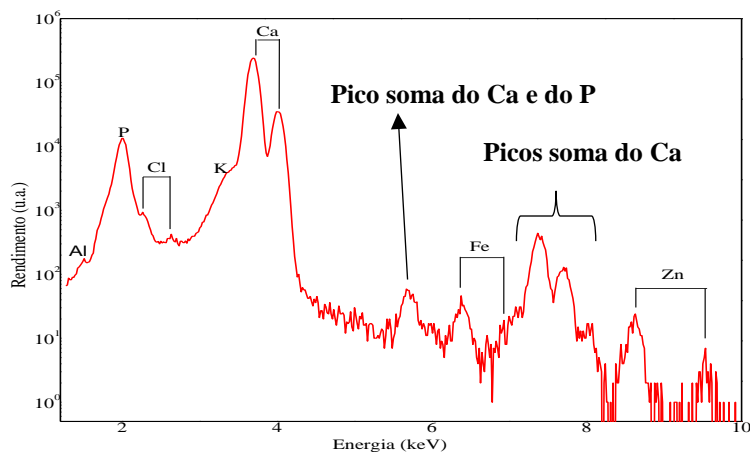


Figura 9) Espectro de  $\mu$ -PIXE obtido na análise de uma amostra de osso do fémur de gato na microsonda nuclear no LATR-CTN/IST com um feixe de prótons de 2 MeV.

Nos espectros de PIXE a radiação de fundo que resulta do *bremsstrahlung* é menor nas regiões de energia superiores a 5 keV, correspondente às energias das radiações K características dos elementos de Z médio ( $20 < Z < 40$ ), do que nas regiões de energia entre 1 - 5 keV, correspondentes às radiações K características dos elementos leves ( $11 < Z < 20$ ) e radiações L de alguns elementos pesados com Z compreendidos entre 31 e 56. Visto que a secção eficaz de ionização aumenta quando o Z diminui, as riscas mais intensas estão normalmente localizadas na zona das baixas energias do espectro [129].

Cada linha de raios-X surge no espectro centrado num determinado canal que está diretamente relacionado com a energia dos raios-X através do processo de formação de pares elétron-lacuna no cristal de silício e subsequente digitalização do impulso analógico de carga num conversor analógico-digital ou, abreviadamente, ADC. A forma do pico é em boa aproximação Gaussiano e a sua largura é determinada tanto pelo ruído no detetor como por estatísticas Fano de formação de carga no cristal. No entanto, a forma final inclui também várias contribuições dos chamados artefactos espectrais. A largura natural das riscas da radiação característica apresenta uma distribuição de *Lorentz*. O perfil de um pico registado com um detetor semiconductor é a convolução desta distribuição de *Lorentz* com a função quase Gaussiana da resposta do detetor o que constitui o chamado perfil de *Voight*. A forma dos picos revela algumas características distintas na cauda do pico, no lado da mais baixa energia, e um

patamar que se estende até a uma energia nula. Isto deve-se essencialmente à coleção incompleta de carga causada por imperfeições do detetor, nomeadamente camada morta e regiões com baixo campo elétrico. A coleção incompleta de carga ocorre quando alguns dos pares eletrão-lacuna não são direcionados para os contatos elétricos o que faz com que o sinal de carga medido seja inferior ao esperado e, conseqüentemente, a energia medida seja inferior à energia dos raios-X incidentes, o que explica este efeito na forma do pico no lado de mais baixa energia. A contribuição dos efeitos de coleção de carga varia entre detetores e pode variar inclusivamente com o tempo para um determinado detetor [130]. A dispersão de *Compton* no detetor, que ocorre sobretudo para fótons com energias superiores a 15 keV, também contribui para o desvio relativamente ao perfil Gaussiano [131, 132].

Existem outras componentes que são detetadas nos espectros obtidos por PIXE, nomeadamente os picos soma e os picos de escape. Os picos soma ocorrem quando dois eventos de picos muito intensos alcançam o detetor em instantes tão próximos que não são distinguidos como dois eventos distintos. O resultado é um pico no espectro com energia igual à soma dos dois fótons. Os picos de escape resultam do escape dos raios-X K do Si após absorção fotoelétrica dos raios-X incidentes perto das extremidades do detetor. A energia depositada no detetor pelos raios-X incidentes aparece com uma energia que é igual à energia original menos a energia do escape do silício. Para um detetor de Si(Li) os picos de escape surgem a uma energia igual à diferença entre a energia dos raios-X característicos e 1.742 keV, correspondente à risca  $K_{\alpha}$  do silício [129].

A deteção da energia dos raios-X emitidos permite a identificação dos elementos presentes na amostra e a determinação da sua intensidade, conhecidos alguns parâmetros físicos e geométricos permite proceder à análise quantitativa.

### **C. Poder de Paragem, Alcance e secção eficaz**

O poder de paragem e o alcance das partículas do feixe no alvo, em conjunto com as secções eficazes de emissão de raios-X constituem grandezas de grande importância na análise quantitativa por PIXE. O poder de paragem linear ( $S$ ) para partículas carregadas num dado material é normalmente definido como a energia perdida ( $dE$ ) por unidade de comprimento ( $dx$ ) ao longo da trajetória do material,

$$S = -\left(\frac{dE}{dx}\right) \quad 2.5$$

e é uma medida da capacidade do alvo para abrandar o feixe. Esta grandeza depende do ião (nomeadamente da sua energia) e do material atravessado. O poder de paragem pode ser calculado com recurso à fórmula de Bethe,

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^4 Z^2}{m_0 v^2} N Z \left[ \ln \left( \frac{2m_0 v^2}{I} \right) - \ln \left( 1 - \frac{v^2}{c^2} \right) - \frac{v^2}{c^2} \right] \quad 2.6$$

Onde,  $v$  e  $ze$  são a velocidade e a carga das partículas incidentes;  $N$  e  $Z$  são a densidade e o número atómico dos átomos do alvo,  $m_0$  é a massa de repouso do eletrão,  $c$  é a velocidade da luz e  $e$  é a carga eletrónica. O parâmetro  $I$  representa o potencial de excitação e de ionização médio do alvo e é normalmente um parâmetro determinado experimentalmente [133].

Os principais processos que contribuem para a perda de energia são a interação de Coulomb com os eletrões (poder de paragem eletrónica,  $S_e$ ) e a interação com os núcleos blindados ou não blindados dos átomos do alvo (poder de paragem nuclear,  $S_N$ ), sendo o poder de paragem total o resultado destas duas contribuições,  $S = S_e + S_N$ . Pela fórmula de Bethe verifica-se que o poder de paragem é proporcional à densidade eletrónica do material. Quando, a velocidade do protão incidente é muito inferior à velocidade dos eletrões atômicos, a dispersão devida ao potencial nuclear começa a ser dominante e o poder de paragem nuclear é o mais importante. O poder de paragem nuclear possui um máximo a uma energia bastante baixa e com o aumento da energia esta contribuição é sucessivamente menor, pelo que nas energias utilizadas normalmente nas nossas análises pode ser desprezado.

O alcance pode ser calculado por integração da equação 2.5 sobre todas as energias da partícula [134]:

$$R = \int_T^0 \left( -\frac{dE}{dx} \right)^{-1} dE \quad 2.7$$

Com o programa TRIM (*TR*ansport of *I*ons in *M*atter) [135] foi possível determinar o alcance de protões com uma energia de 2.8 MeV, principal energia das análises por PIXE e por PIGE do presente trabalho, para tecido trabecular e para tecido da cartilagem. Para o osso trabecular obteve-se um valor de 116  $\mu\text{m}$  para o alcance e para a cartilagem o alcance calculado foi 123  $\mu\text{m}$  (figura 10).

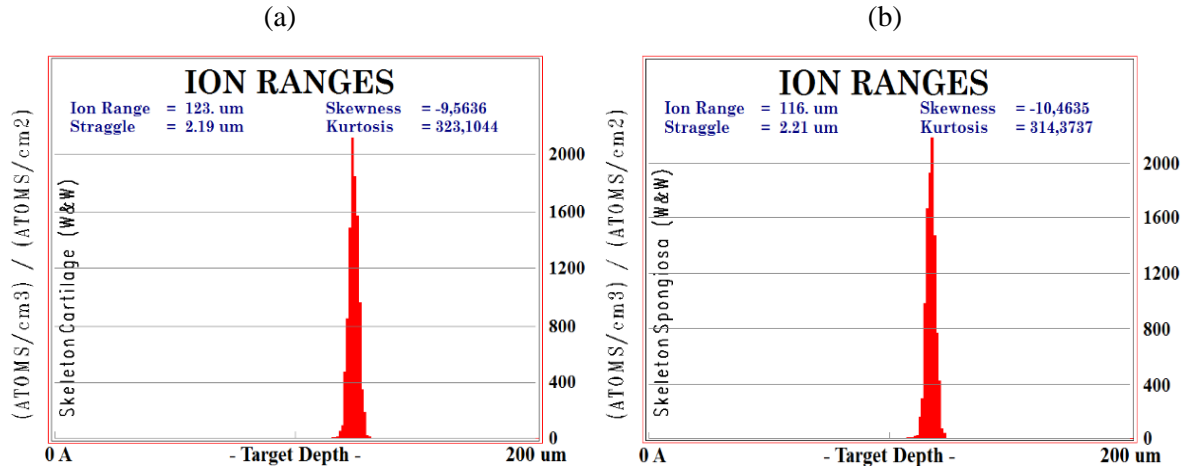


Figura 10) Alcance de um feixe de  $H^+$  com energia 2800 keV em (a) tecido da cartilagem e (b) tecido esponjoso.

A secção eficaz de paragem, é definida como a perda de energia por átomo por unidade de área do material atravessado e é independente da densidade volúmica do material, e pode ser obtida através das expressões,

$$S_a = \rho_Z^{-1} \frac{dE}{dx} \text{ ou } S_m = \rho^{-1} \frac{dE}{dx} \quad 2.8$$

onde,  $S_a$  é a secção eficaz de paragem atómica,  $S_m$  é a secção eficaz de paragem mássica,  $\rho_Z$  é a densidade atómica (por exemplo, em átomos/cm<sup>3</sup>) e  $\rho$  é a densidade mássica (por exemplo, em gramas/cm<sup>3</sup>) [130]. Os valores da secção eficaz de paragem encontram-se tabelados para prótons e partículas alfa. Para compostos ou misturas a perda de energia é obtida pela lei de Bragg. Segundo esta lei se o composto contém A e B com a proporção estequiométrica  $A_m B_n$  a secção eficaz de paragem do composto,  $S^{AB}$ , é dada pela média pesada das secções eficazes de paragem parciais,  $S^A$  e  $S^B$ , ou seja,  $S^{AB} = mS^A + nS^B$ .

A secção eficaz de ionização pode ser definida numa abordagem probabilística como a quantificação do número de ionizações que ocorrem. A secção eficaz teórica de ionização por partículas carregadas não é descrita por uma equação simples. A teoria que melhor descreve a interação é feita pelo modelo ECPSSR (*Energy-loss Coulomb Perturbed Stationary State Relativistic*) o qual tem em conta o desvio do projétil pelo campo Coulombiano (C), a perturbação causada nos estados atómicos estacionários (PSS), efeitos relativistas (R) e a perda de energia (E) durante a colisão. Este modelo resulta de correções ao modelo PWBA (*Plane Wave Born Approximation*) o qual prevê uma variação da secção eficaz com  $E^4/Z^{12}$ , sendo  $E$  a energia do projétil e  $Z$  o número atómico do elemento bombardeado [136, 137, 138].

A relação entre a secção eficaz de ionização para a camada K e a secção eficaz de produção de radiação  $X_{K\alpha}$  ( $\sigma_{K\alpha}$ ) para um determinado elemento e energia das partículas incidentes é dada por:

$$\sigma_{K\alpha} = b_{K\alpha} \omega_K \sigma_{iK} \quad 2.9$$

Em que  $\sigma_{iK}$  é a secção eficaz de ionização da camada K,  $b_{K\alpha}$  a intensidade relativa da risca  $K_\alpha$  e  $\omega_K$  o rendimento de fluorescência da camada K [130].

#### D. Relação entre intensidades de raios-X e concentração

A energia perdida pelo protão em cada dispersão inelástica numa amostra de espessura finita é muito pequena, pelo que a sua trajetória pode ser representada, numa boa aproximação, por uma linha reta, como exemplificado na figura 11. Ao longo desta linha a perda de energia do feixe por unidade de espessura mássica, depende da constituição maioritária da amostra (matriz), que é o somatório ponderado dos poderes de paragem individuais dos elementos principais que compõem a amostra, cuja densidade é  $\rho$  e que constitui a secção eficaz de paragem definida anteriormente.

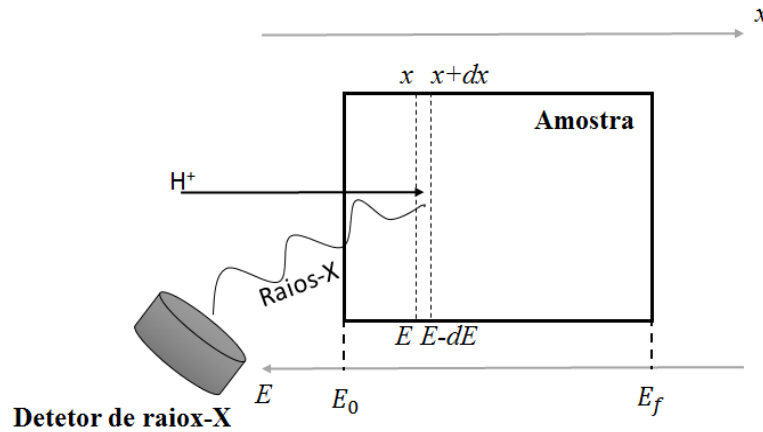


Figura 11) Esquematização do processo de formação e deteção de raios-X.

Considerando um feixe com  $N_p$  protões a incidir num alvo constituído por  $N_A$  átomos por  $cm^2$ , com uma densidade atómica  $\rho_Z$  para o elemento Z, o número de lacunas na camada K pode ser obtido a partir da expressão,

$$dN_K = \frac{Q}{e} \rho_Z \sigma_Z dx \quad 2.10$$



em que,  $\frac{Q}{e}$  é o número de partículas incidentes. Esta expressão que relaciona o número de lacunas produzidas num intervalo da trajetória  $dx$ , pode ser reescrita em função da perda de energia dos iões nesse intervalo de espessura,

$$dN_K = \frac{N_p N_{av} C_Z \sigma_Z(E) dE}{A_Z S_m(E)} \quad 2.11$$

onde,  $Z$  é o número atômico,  $A_Z$  é a massa atômica,  $C_Z$  é a concentração,  $N_{av}$  o número de Avogadro e  $\sigma_Z(E)$  a secção eficaz de ionização da camada  $K$  para o protão de energia  $E$  a uma profundidade  $x$ .

O rendimento de raios-X depende do número de lacunas, do rendimento de fluorescência,  $\omega_{K,Z}$ , da intensidade relativa da linha,  $b_{K,Z}$  (*branching ratios*), da transmissão através da amostra,  $T_Z(E)$ , da eficiência intrínseca do detetor  $\varepsilon_Z^i$  e do ângulo sólido e é dado pela expressão,

$$dY(Z) = dN_K \omega_{K,Z} b_{K,Z} \varepsilon_Z^i \Omega T_Z(E) \quad 2.12$$

em que  $dN_K$  é dado pela expressão 2.11. A integração sobre todos os segmentos da trajetória do protão dá a intensidade total ou o rendimento de cada raios-X característico:

$$Y(Z) = \frac{N_{av} \omega_{K,Z} b_{K,Z} t_{K,Z} \varepsilon_Z^i (\Omega/4\pi)}{A_Z} N_p C_Z \int_{E_0}^{E_f} \frac{\sigma_Z(E) T_Z(E)}{S_m(E)} dE \quad 2.13$$

onde,  $E_0$  e  $E_f$  são as energias inicial e final do protão, respetivamente,  $\Omega/4\pi$  é o ângulo sólido subentendido pelo detetor,  $\varepsilon_Z^i$  é a eficiência intrínseca do detetor e  $t_{K,Z}$  é a transmissão através de qualquer filtro colocado entre a amostra e o detetor. No caso das amostras espessas, que travam por completo o feixe de protões, que é o caso das amostras analisadas neste trabalho, a energia final é zero. Para os raios-X L o cálculo é mais complicado devido à existência de três subcamadas,  $L_1$ ,  $L_2$  e  $L_3$  e pela necessidade de incluir três rendimentos de fluorescência, para cada subcamada,  $\omega_{Li,Z}$ , e três probabilidades  $f_{12}$ ,  $f_{13}$  e  $f_{23}$  para os processos *Coster – Kronig* [139].

No caso de amostras espessas de matriz conhecida, o rendimento para um dado elemento de número atômico  $Z$  é dado por,

$$Y(Z) = H C_Z Y_l(Z) Q \varepsilon_Z t_Z \quad 2.14$$

Em que  $Y_l(Z)$  é o rendimento teórico de raios-X por unidade de ângulo sólido, por unidade de concentração e por unidade de carga. O ângulo sólido do detetor e qualquer fator de calibração para a carga integrada  $Q$  são combinados numa única constante instrumental,  $H$ , que pode ser determinada com recurso a padrões [129]. No caso das amostras de osso, os elementos maioritários da matriz são conhecidos, visto que a componente mineral é essencialmente hidroxiapatite e, é constituída maioritariamente por Ca, P, O e H, que constituem no total mais

de 99.9 % da matriz. Foram também feitas análises complementares de  $\mu$ -XRF e de PIGE para determinar com mais rigor a composição da matriz.

## **2. PIGE - Emissão de Radiação-Gama Induzida por Partículas Carregadas**

A técnica de PIGE baseia-se na detecção da radiação gama proveniente de reações nucleares com os átomos do alvo quando bombardeado por um feixe de partículas. Pode afirmar-se que esta técnica é complementar da técnica de PIXE dado que permite a identificação e quantificação de elementos mais leves do que o silício. Isto pode ser explicado pelo fato de que para elementos com número atómico inferior a 14, os raios-X detetáveis têm energias inferiores a 2 keV, muito próximas do limite mínimo do intervalo de energias a que os detetores de silício são sensíveis. Nomeadamente, com o detetor utilizado nas análises de PIXE só era possível detetar raios-X com energias superiores a 2 keV, como será explicado adiante. No intervalo típico de energias de análise por PIXE, 2-4 MeV, ocorrem essencialmente interações de Coulomb entre as partículas carregadas e os eletrões do meio, no entanto, o projétil pode também participar em reações nucleares com os elementos leves da matriz das quais pode resultar a emissão de radiação gama [129]. A análise de um espectro de radiação gama permite a identificação e a quantificação dos elementos leves presentes na amostra. Esta quantificação só é possível se se conhecer a secção eficaz. Ao contrário das secções eficazes de emissão de raios-X que evoluem lentamente com a energia do feixe incidente, as secções eficazes das reações nucleares sofrem alterações bruscas com a variação da energia do feixe e para muitos elementos esta informação ainda não está disponível e constitui umas das principais dificuldades associadas a uma análise quantitativa sem padrões. É possível consultar as secções eficazes disponíveis, e que podem ser usadas em análises por feixe de iões, no IBANDL (*Ion Beam Analysis Nuclear Data Library*) [140]. Nos casos em que se desconhece a secção eficaz a análise fica limitada a uma análise comparativa utilizando amostras padrão de matriz semelhante à das amostras em estudo. A técnica de PIGE já foi aplicada para análises de amostras de osso para determinar as concentrações de elementos leves como o sódio, o flúor, o magnésio, mas também para determinação do cálcio e do fósforo, no entanto, a quantificação destes elementos foi baseada em método comparativos [17, 18]. Esta técnica apresenta uma

vantagem evidente na análise das amostras ósseas, nomeadamente para quantificação de quantidades reduzidas de elementos leves. Atendendo a que, para as energias típicas de análise, as secções eficazes das reações nucleares para elementos de baixo  $Z$  são elevadas, os componentes maioritários, Ca e P, originam picos que são da mesma ordem de magnitude que os dos elementos leves presentes na amostra [129, 133].

No presente trabalho a técnica de PIGE foi aplicada sobretudo para quantificação do fósforo através da reação de dispersão inelástica  $^{31}\text{P}(p, p'\gamma)\text{P}^{31}$  para a radiação gama de  $1266\text{ keV}$ , embora também nos tenha permitido analisar elementos como o flúor ( $^{19}\text{F}(p, p'\gamma)\text{F}^{19}$ ,  $\gamma_1 = 110\text{ keV}$ ,  $\gamma_2 = 197\text{ keV}$ ), o sódio ( $^{23}\text{Na}(p, p'\gamma)\text{Na}^{23}$ ,  $\gamma_1 = 440\text{ keV}$ ) e o magnésio ( $^{25}\text{Mg}(p, p'\gamma)\text{Mg}^{25}$ ,  $\gamma_1 = 585\text{ keV}$ ). Para que a secção eficaz para esta reação fosse suficientemente elevada a análise das amostras foi feita maioritariamente com um feixe de prótons com energia igual a  $2.8\text{ MeV}$ , valor compreendido no intervalo de energias mais indicado para a análise PIXE. Este compromisso é fundamental dado que as análises PIXE e PIGE foram feitas simultaneamente.

A quantificação do fósforo foi feita através do programa ERYA (*Emitted Radiation Yield Analysis*) [141], desenvolvido pelo grupo de reações nucleares do LIBPhys, e foi possível fazê-lo sem recurso a padrões pois a secção eficaz para a reação referida foi medida no âmbito deste trabalho, pelo nosso grupo, para o intervalo de energias de  $2$  a  $4\text{ MeV}$ , que engloba a gama de energias das análises deste trabalho. As condições experimentais e os resultados da secção eficaz medida e comparação com os resultados disponíveis na literatura serão apresentados no capítulo 4.

## A. Princípio Físico da Técnica de PIGE

O processo segundo o qual ocorre interação de uma partícula com o núcleo denomina-se reação nuclear e pode ser representado genericamente por  $X + a \Rightarrow Y + b$  ou por  $X(a, b)Y$ , em que  $a$  é a partícula incidente e  $a + X$  representa o canal de entrada sendo  $b + Y$  o canal de saída. Ao canal de saída pode estar associada a emissão de um fóton gama. Por norma, o mesmo canal de entrada pode originar múltiplos canais de saída que competem entre si. Nem todas as reações são energeticamente permitidas, introduzindo-se a definição do valor  $Q$  da reação que é um parâmetro que permite avaliar quando a reação pode ou não ocorrer. Quando o valor  $Q$  da reação é positivo o canal de saída é energeticamente permitido para qualquer energia cinética

da partícula incidente. Nos casos em que é negativo o canal de saída é energeticamente proibido quando a energia cinética da partícula incidente é inferior ao valor absoluto de  $Q$ . Este valor pode ser determinado a partir das massas das partículas que caracterizam o canal de entrada e o canal de saída,

$$Q = (m_X + m_a - m_Y - m_b)c^2 \quad 2.15$$

em que,  $m_X$  e  $m_a$  são as massas das partículas do canal de entrada,  $m_Y$  e  $m_b$  são as massas das partículas do canal de saída e  $c$  é a velocidade da luz.

A reação nuclear estudada neste trabalho é uma reação nuclear de dispersão inelástica,  $(p, p'\gamma)$  e apresenta valor de  $Q$  da reação nulo. Podem ocorrer também reações nucleares de transferência,  $(p, \alpha\gamma)$  e de captura radiativa  $(p, \gamma)$ . Quanto ao processo de interação a reação pode ser direta ou de núcleo composto. No caso das reações diretas, a partícula incidente interatua superficialmente transferindo a sua energia para poucos nucleões. Nas reações nucleares por núcleo composto a energia transferida é partilhada por todos os nucleões e o sistema perde a memória do canal de entrada. Entre estas duas situações definem-se as chamadas reações de ressonância, em que é formado um estado semi-ligado antes de haver emissão do produto leve. Quando a secção eficaz em função da energia exibe ressonâncias significa que para uma dada energia da partícula incidente a energia disponível coincide com um estado excitado do núcleo composto. A presença de um fundo contínuo crescente é característico da componente direta.

## B. Espectro de radiação Gama

O espectro de radiação gama inclui os picos de energia correspondentes à emissão gama proveniente das reações nucleares já referidas. As larguras dos picos das ressonâncias dependem essencialmente da largura natural da ressonância e da dispersão do feixe. Na prática, a largura experimental da ressonância é maior devido à largura natural da ressonância, à resolução em energia do feixe e à dispersão em energia (*straggling*) das partículas do feixe durante a perda de energia no alvo. No espectro gama o ruído eletrónico é praticamente inexistente. A radiação de fundo tem uma componente continua que se deve essencialmente à dispersão de *Compton* da radiação gama de energia mais elevada e, os picos de radioisótopos naturais dos materiais envolventes e resultantes de reações do feixe primário com contaminantes ou com outros componentes da instalação, nomeadamente com colimadores.

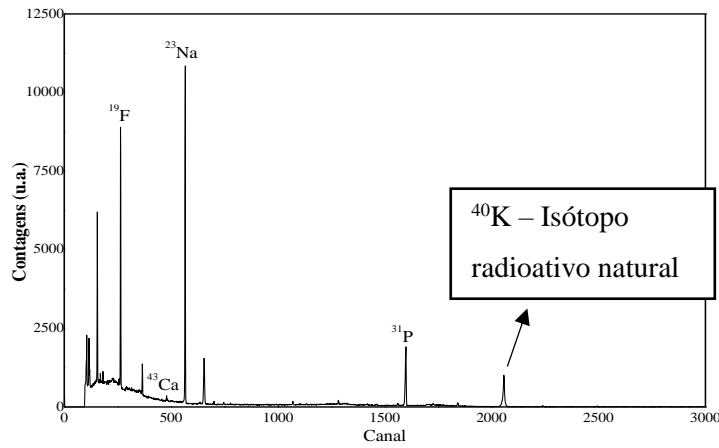


Figura 12) Espetro gama obtido pela análise PIGE de amostra de osso do fémur humano com um feixe de  $H^+$  com energia 2.8 MeV.

No espectro estão identificados os picos correspondentes às emissões gama devido a reações nucleares com os isótopos assinalados. No caso do fósforo como foi referido, observa-se no espectro um pico para uma energia de 1266 keV correspondente à emissão gama da reação  $^{31}P(p, p'\gamma)P^{31}$ . Para o sódio, a risca de 440 keV deve-se à reação de dispersão inelástica  $^{23}Na(p, p'\gamma)Na^{23}$ . É possível identificar também no espectro a risca de 197 keV correspondente à reação nuclear  $^{19}F(p, p'\gamma)F^{19}$ , e também uma outra risca a 373 keV que se deve a uma reação de dispersão inelástica com o isótopo  $^{43}Ca$ ,  $^{43}Ca(p, p'\gamma)Ca^{43}$ . Embora seja possível ver no espectro a risca correspondente ao cálcio, optou-se por não fazer a quantificação deste elemento por PIGE dado que a secção eficaz para esta reação não está disponível na literatura. A quantificação deste elemento teria que ser feita recorrendo a um método meramente comparativo, utilizando amostras com uma matriz semelhante ao osso cujas concentrações dos seus elementos fossem conhecidas. Uma amostra deste tipo seria por exemplo uma pastilha de fosfato de cálcio. O método comparativo baseia-se em cálculos usando os poderes de paragem do feixe de prótons para a energia de análise na amostra e no padrão. A relação entre as frações mássicas do elemento na amostra e no padrão é dada por:

$$\frac{f_m^a}{f_m^p} = \frac{S^a}{S^p} \cdot \frac{Y^a}{Y^p} \quad 2.16$$

Onde,  $f_m^a$ ,  $S^a$ ,  $Y^a$  representam as frações mássicas, os poderes de paragem (para uma energia em que o rendimento gama é cerca de metade do obtido à energia incidente) e os rendimentos gama da amostra e  $f_m^p$ ,  $S^p$ ,  $Y^p$  representam as frações mássicas, os poderes de paragem (para

uma energia em que o rendimento gama é cerca de metade do obtido à energia incidente) e os rendimentos gama do padrão [142].

### C. Poder de Paragem, Alcance e Secção Eficaz

O poder de paragem e o alcance já foram descritos no subcapítulo 2.1.C. A secção eficaz define a probabilidade de os vários tipos de reacção ocorrerem e depende da energia da partícula incidente e do parâmetro de impacto relativo aos núcleos do alvo. Se o detetor estiver posicionado de forma a coletar as partículas emitidas numa direcção  $(\theta, \phi)$  em relação à direcção do feixe incidente, definindo um angulo sólido pequeno  $d\Omega$  e sendo  $I_a$  a corrente das partículas incidentes por unidade de tempo que interagem com  $N$  núcleos do alvo por unidade de área e  $R_b$  a taxa de produção das partículas  $b$  do canal de saída, a secção eficaz da reacção  $\sigma$  é dada por:

$$\sigma = \frac{R_b}{I_a N} \quad 2.17$$

Dado que o detetor cobre um ângulo sólido pequeno ( $d\Omega$ ), não consegue detetar todas as partículas do canal de saída, apenas uma pequena fração,  $dR_b$ , pelo que apenas uma pequena fração da secção eficaz pode ser deduzida,  $d\sigma$ . Além disso, as partículas não são emitidas uniformemente em todas as direcções, apresentando uma distribuição angular que depende de  $\theta$  e de  $\phi$ . Representando-se a distribuição angular por  $r(\theta, \phi)$ , obtém-se:

$$dR_b = r(\theta, \phi) \frac{d\Omega}{4\pi} \quad 2.18$$

Combinando as expressões 2.17 e 2.18 obtém-se a secção eficaz diferencial,

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{r(\theta, \phi)}{4\pi I_a N} \quad 2.19$$

A seção eficaz pode ser calculada por integração da secção eficaz diferencial para todos os ângulos, e fazendo  $d\Omega = \sin(\theta)d\theta d\phi$ , obtendo-se:

$$\sigma = \int \frac{d\sigma}{d\Omega} d\Omega = \int_0^\pi \sin(\theta) d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \frac{d\sigma}{d\Omega} \quad 2.20$$

Quando as reacções têm geometria axial, ou seja,  $\frac{d\sigma}{d\Omega}$  é independente de  $\phi$ , a secção eficaz total é dada por:

$$\sigma = 4\pi \frac{d\sigma}{d\Omega} \quad 2.21$$

A distribuição angular da radiação gama resulta do alinhamento dos subestados magnéticos do estado excitado pelo que tem um comportamento proporcional a  $\cos^2\theta$ , sendo  $\theta$  o ângulo de detecção. Consequentemente, para um ângulo de detecção perto de  $125^\circ$ , a equação 2.21 para radiação isotrópica aplica-se.

#### D. Relação entre intensidades de radiação $\gamma$ e concentração

O cálculo do rendimento diferencial associado à emissão de radiação gama é semelhante ao cálculo do rendimento de raios-X com a diferença que o fator de transmissão através da amostra é igual à unidade, dado que a atenuação da radiação gama na amostra é desprezável, e o fator de transmissão através de filtros também é considerado como unitário visto que em PIGE não são usados filtros. A diferença relativamente à equação 2.12 é que a secção eficaz de produção de raios-X e a fração de intensidade da linha são substituídos pela secção eficaz da reação nuclear e pela fração isotópica. Assim sendo, o rendimento diferencial de radiação gama, quando um feixe de iões incide sobre um alvo fino é dado pela expressão:

$$dY(E) = \varepsilon_{abs}(E_\gamma) \frac{Q}{e} \sigma(E) f_m f_i N_{Av} A^{-1} d\Gamma \quad 2.22$$

Onde,  $\varepsilon_{abs}$  é a eficiência absoluta do detetor para a energia  $E_\gamma$  do fóton emitido,  $\left(\frac{Q}{e}\right)$  é o numero de prótons que incidem sobre o alvo,  $\sigma(E)$  é a secção eficaz da reação à energia  $E$ , expressa em barn e  $d\Gamma$  representa a espessura do filme. O rendimento depende do número de isótopos associados ao canal de entrada da reação, por unidade de espessura, presentes na amostra. O número de isótopos é dado pelo produto  $(f_m f_i N_{Av} A^{-1})$  onde  $f_m$ ,  $f_i$ ,  $N_{Av}$  e  $A^{-1}$  representam a fração mássica, a fração isotópica, o número de *Avogadro* e o número de massa do elemento associado ao isótopo em estudo, respetivamente.

Se o alvo for espesso, situação em que a espessura da amostra é superior ao alcance das partículas, o rendimento da emissão gama fica associado à profundidade atingida pelos iões no seu interior. A dependência da secção eficaz com a perda de energia dos iões obtém-se por integração da equação 2.22, pelo que, para alvos espessos o rendimento vem dado por,

$$Y(E) = \varepsilon_{abs}(E_\gamma) \frac{Q}{E} f_m f_i N_{Av} A^{-1} \int_0^{E_0} \frac{\sigma(E)}{S_m(E)} dE \quad 2.23$$

Em que  $E_0$  é a energia do feixe incidente e  $S_m(E)$  é a secção eficaz de paragem. A grande dificuldade no cálculo do rendimento reside na resolução do integral. Uma possível resolução

consiste em transformar o integral num somatório de integrais desde que, no domínio de integração em cada um deles, a perda de energia dos iões não varie muito. Foi esta a aproximação usada no programa de cálculo ERYA [141], aplicado para quantificação neste trabalho.

### **3. Micro - Fluorescência de Raios-X**

A fluorescência de raios-X é uma técnica de análise bem estabelecida que permite uma análise multi-elementar com detecção simultânea de vários elementos em amostras sólidas ou líquidas com elevadas sensibilidades de detecção, na ordem dos microgramas por grama para a maioria dos elementos. O princípio físico da técnica é semelhante ao do PIXE, e a diferença reside na ionização dos átomos da amostra que se deve à interação com os raios-X do feixe primário. Os elementos podem ser identificados através do comprimento de onda (espectroscopia de raios-X dispersiva em comprimento de onda, WDS - *Wavelength Dispersive X-ray Spectroscopy*) ou da energia (espectroscopia de raios-X dispersiva em energia, EDS – *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) dos raios-X coletados. As concentrações dos elementos presentes na amostra são determinadas pela intensidade desses raios-X conhecidos outros parâmetros físicos e geométricos da análise [143, 144].

#### **A. Princípio Físico da Técnica**

Ao contrário do PIXE em que a ionização resulta do bombardeamento da amostra com partículas carregadas, no caso do  $\mu$ -XRF deve-se aos processos de interação dos raios-X do feixe primário com os átomos da amostra. Quando o feixe de raios-X passa através da matéria, alguns fótons vão ser absorvidos no interior do material ou dispersos como ilustrado na figura 13.



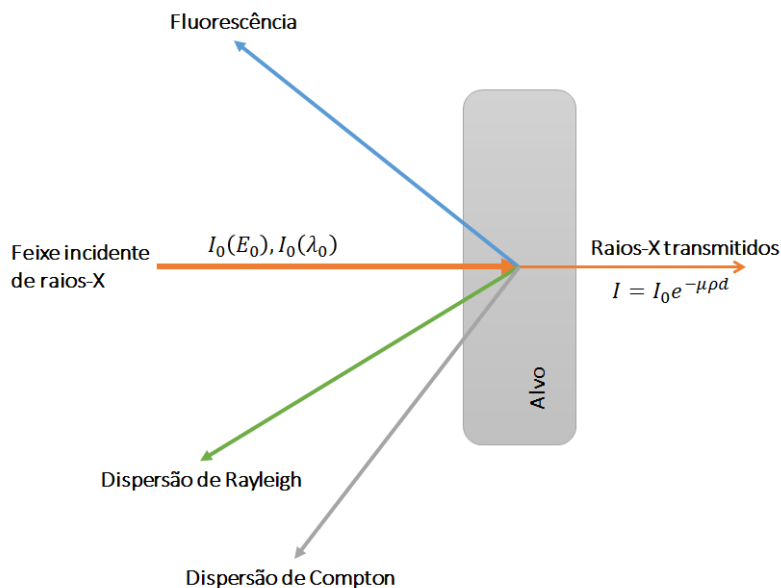


Figura 13) Interação dos raios-X com a matéria [144].

As interações dos fótons com a matéria são classificadas de acordo com o tipo de alvo (elétrons, átomos ou núcleos) e o tipo de evento (absorção, dispersão ou produção de pares). No caso das interações com os elétrons atômicos pode ocorrer **efeito fotoelétrico** com uma probabilidade proporcional a  $Z^4$ , para baixas energias, ou proporcional a  $Z^5$ , para energias mais elevadas, **dispersão de Rayleigh** com uma secção eficaz proporcional a  $Z^2$  e **dispersão de Compton** com uma secção eficaz proporcional ao número atômico do elemento. No processo de absorção fotoelétrica, um fóton é completamente absorvido pelo átomo e é ejetado um elétron de uma camada interior. A absorção fotoelétrica é possível apenas se a energia do fóton for igual ou superior à energia de ligação do elétron. Dado que a absorção fotoelétrica pode ocorrer para cada nível de energia do átomo, a secção eficaz total do efeito fotoelétrico  $\tau_i$  é a soma das contribuições das sub-camadas específicas,

$$\begin{aligned}\tau_i &= \tau_{i,K} + \tau_{i,L} + \tau_{i,M} + \dots \\ &= \tau_{i,K} + (\tau_{i,L1} + \tau_{i,L2} + \tau_{i,L3}) + (\tau_{i,M1} + \dots + \tau_{i,M5}) + \dots\end{aligned}\tag{2.24}$$

A determinação de um elemento aplicando a técnica de XRF pode ser efetuada com grande sensibilidade se a radiação de excitação tiver a sua intensidade máxima a uma energia imediatamente acima da transição da série espectral correspondente à camada de maior energia (K) desse elemento. É esta a particularidade que faz com que o SR-XRF apresente sensibilidades muito elevadas, na ordem dos nanogramas por grama, para certos elementos [145]. A dispersão é o tipo de interação que faz com que o fóton mude a sua direção. Se a energia do fóton é a mesma antes e após a dispersão, o processo é denominado dispersão elástica

ou dispersão de Rayleigh. Se o fóton perde alguma da sua energia, o processo denomina-se dispersão inelástica ou dispersão de Compton. Assim, a secção eficaz total para a dispersão,  $\sigma_i$ , é o somatório de duas componentes  $\sigma_{R,i} + \sigma_{C,i}$ , em que  $\sigma_{R,i}$  e  $\sigma_{C,i}$  são as secções eficazes para a dispersão de Rayleigh e de Compton para o elemento i, respetivamente. O rendimento de fluorescência é um parâmetro fundamental na quantificação em  $\mu$ -XRF e está descrito no subcapítulo 2.1.A.

## B. Espectro de raios-X

Como já foi referido anteriormente, o espectro de raios-X é caracterizado pela presença dos picos dos raios-X característicos dos elementos presentes na amostra sobrepostos num fundo contínuo. No subcapítulo 2.1.B foi explicado em pormenor todos os componentes de um espectro de raios-X. O WinAXIL® (versão do Windows do programa *Analysis of X-ray spectra by Iterative Least Squares*) [145], programa utilizado neste trabalho para quantificação, tem em consideração os picos soma e os picos de escape mas não reintegra a intensidade perdida no pico que lhe deu origem. No caso da coleção incompleta de carga estes programas incluem uma função que a descreve e que é incorporada no modelo do pico Gaussiano [146]. Ao contrário do que acontece no PIXE a radiação de fundo deve-se essencialmente à dispersão coerente e incoerente da radiação de excitação pela amostra. Mais uma vez, a forma da radiação de fundo pode ser bastante complicada e depende da forma do espectro de excitação, da composição da amostra, dos processos de coleção de carga sobretudo das linhas de fluorescência mais intensas, entre outros.

No espectro de raios-X obtido numa análise no espectralómetro M4-Tornado da Bruker (equipamento apresentado no subcapítulo 3.2), é possível observar ainda as riscas correspondentes ao material do ânodo, nomeadamente as riscas  $K_\alpha$  e  $K_\beta$  do rádio e, é possível observar riscas do zircónio que é o material do colimador. A figura 14 mostra um espectro típico obtido na análise das amostras ósseas por micro- fluorescência de raios-X:

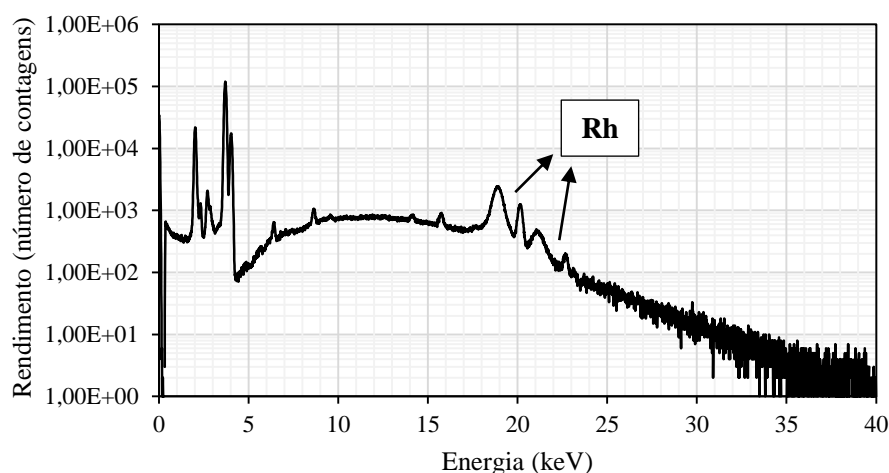


Figura 14) Espectro de raios-X de uma amostra de osso saudável analisada por  $\mu$ -XRF no M4-Tornado da Bruker (FCT-UNL), nas condições 50 kV, 100  $\mu$ A sem filtros.

Na zona de mais baixas energias do espectro é essencialmente o ruído eletrónico que contribui para a radiação. Na zona de mais altas energias do espectro, como referido, é possível ver os picos da dispersão de *Rayleigh* dos raios-X do ródio, identificados nas figuras 14 e 15, e os picos da dispersão de Compton que aparecem desviados no sentido de menor energia do espectro. A utilização de filtros à saída do tubo de raios-X permite reduzir a quantidade de fundo sobretudo na zona das altas energias como é possível ver na figura 15, que mostra um espectro da mesma amostra de osso resultante de uma análise em que foi aplicado um filtro de Al/Ti/Cu – 100/50/25  $\mu$ m.

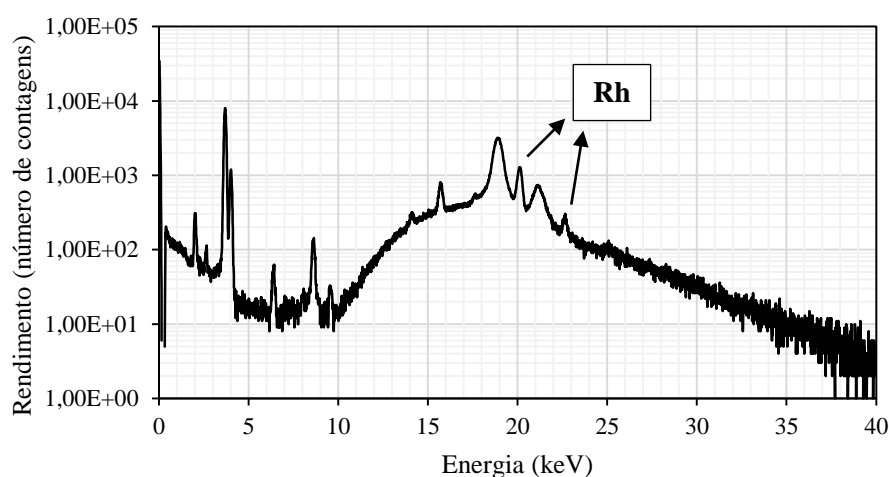


Figura 15) Espectro de raios-X de uma amostra de osso saudável analisada por  $\mu$ -XRF no M4-Tornado da Bruker (FCT-UNL), nas condições 50 kV, 600  $\mu$ A com um filtro de Al/Ti/Cu – 100/50/25  $\mu$ m.

### C. Secção eficaz total de colisão e Coeficiente mássico de atenuação

A absorção da radiação na matéria é o efeito cumulativo de vários tipos de processos de interação que ocorrem em paralelo. A probabilidade de cada um dos processos de interação pode ser expressa na forma de secção eficaz de colisão por átomo, por eletrão ou por núcleo no alvo. A soma de todas as secções eficazes, é então a probabilidade de que o fóton incidente tenha uma interação de qualquer tipo ao passar pela amostra,

$$\sigma_{tot} = \tau + \sigma_R + \sigma_C + \dots \quad 2.25$$

em que  $\tau$  é a secção eficaz total de absorção fotoelétrica,  $\sigma_R$  e  $\sigma_C$  são as secções eficazes de Rayleigh e de Compton, respetivamente. A secção eficaz total de colisão por átomo,  $\sigma_{tot}$ , quando multiplicada pelo número de átomos por centímetro cúbico do alvo, é o coeficiente de atenuação linear  $\mu^*$  por centímetro percorrido na amostra,

$$\mu^* \left( \frac{1}{cm} \right) = \sigma_{tot} \left( \frac{cm^2}{\text{átomos}} \right) \rho \left( \frac{g}{cm^3} \right) \frac{N_A}{A} \left( \frac{\text{átomos}}{g} \right) \quad 2.26$$

onde  $\rho$  é a densidade do meio e  $N_A$  é o número de *Avogadro*. O coeficiente mássico de atenuação  $\mu$  é a razão entre o coeficiente de atenuação linear e a densidade do material.

Para feixes estreitos, paralelos e monocromáticos, a atenuação dos fótons é homogénea na matéria e é descrita pela lei de Lambert-Beer,

$$I = I_0 e^{-\mu^* t} \quad 2.27$$

onde  $I$  é a intensidade transmitida,  $I_0$  é a intensidade incidente e  $t$  é a espessura do alvo em centímetros. Se o alvo é um composto ou uma mistura, o coeficiente mássico de atenuação pode ser aproximadamente obtido pelos coeficientes  $\mu_i$  dos elementos que constituem a amostra de acordo com a média ponderada,

$$\mu = \sum_{i=1}^n W_i \mu_i \quad 2.28$$

onde  $W_i$  é a fração mássica do  $i$ -ésimo elemento e  $n$  é o número total de elementos no alvo. Esta expressão constituiu a chamada regra das misturas. O coeficiente mássico de atenuação ( $\mu$ ) desempenha um importante papel em análise quantitativa por XRF. Tanto a radiação de excitação primária como a radiação de fluorescência são atenuadas na amostra. Para relacionar a intensidade de fluorescência observada com a concentração, esta atenuação deverá ser incluída na quantificação [139].

## D. Relação entre intensidades de raios-X e concentração

A análise quantitativa é útil quando se pretende obter informação acerca da quantidade relativa dos elementos presentes numa amostra. O método mais comum, aplicado em cálculos quantitativos em XRF, é o chamado método dos parâmetros fundamentais que se fundamenta nos pressupostos de que, todos os elementos estão igualmente distribuídos na amostra, os efeitos de outros elementos presentes na amostra (denominados efeitos de matriz) podem ser determinados a partir dos parâmetros físicos conhecidos, a intensidade da radiação de fluorescência é proporcional à concentração do elemento medido e a intensidade medida depende da configuração experimental e das condições de medição. A figura 16 esquematiza a geometria típica de excitação e deteção dos raios-X provenientes da amostra.

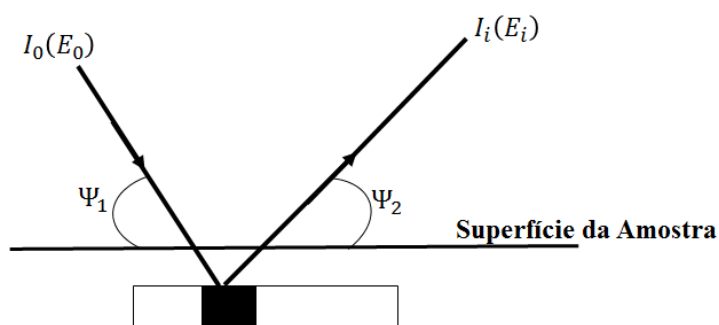


Figura 16) Esquematização da geometria de excitação e deteção da radiação característica da amostra.

Quando radiação primária de intensidade  $I_0$  é aplicada para irradiar uma amostra completamente homogênea de espessura  $T$  (cm) a intensidade da radiação de fluorescência,  $I_Z(E_Z)$  para um dado elemento  $Z$  é o resultado da fluorescência primária e dos efeitos entre elementos da amostra que estão relacionados com a radiação secundária produzida na amostra. Como a radiação característica é emitida pelos elementos constituintes da amostra, é absorvida pelos elementos da matriz por uma quantidade relativa aos respetivos coeficientes mássicos de atenuação. Assim sendo, esta intensidade relaciona-se com a concentração desse elemento, através da expressão,

$$I_Z(E_Z) = I_0 K_Z m C_Z A_Z \quad 2.29$$

onde,  $K_Z$  é o fator de calibração,  $C_Z$  é a concentração do elemento  $Z$ ,  $m$  é a massa da amostra por unidade de área e  $A_Z$  é o fator de atenuação. Devido à atenuação no detetor, os raios-X de mais baixa energia não são detetados e os elementos leves não podem ser determinados por esta técnica. No entanto, quando se analisam amostras biológicas os elementos leves (C, O, H) são

elementos majoritários e têm um contributo importante no fator de atenuação,  $A_Z$ , que é dado pela expressão,

$$A_Z = \frac{1 - e^{-\sum_j c_j \left[ \frac{\mu(E_{1,Z})}{\rho \sin \varphi_1} + \frac{\mu(E_{Z,j})}{\rho \sin \varphi_2} \right] m}}{\sum_j c_j \left[ \frac{\mu(E_{1,j})}{\rho \sin \varphi_1} + \frac{\mu(E_{Z,j})}{\rho \sin \varphi_2} \right] m}, \quad \sum_j c_j = 1 \quad 2.30$$

Onde,  $\frac{\mu}{\rho}(E_{1,j})$  corresponde ao coeficiente mássico de atenuação do elemento j para a energia incidente e  $\frac{\mu}{\rho}(E_{Z,j})$  é o coeficiente mássico de atenuação do elemento j para a energia característica do elemento Z. Os ângulos da radiação incidente e da radiação emitida são dados respetivamente por  $\varphi_1$  e  $\varphi_2$ . O fator de calibração é obtido através da expressão,

$$K_Z = \Omega \varepsilon_Z c'_Z \omega_Z \sigma_{X_Z} P_{L \rightarrow M} \quad 2.31$$

Em que,  $\Omega$  é o ângulo sólido do detetor,  $\varepsilon_Z$  é a eficiência do detetor para o elemento Z,  $c'_Z$  é a absorção no ar e janela do detetor dos raios-X característicos do elemento Z,  $\omega_Z$  é o rendimento de fluorescência do elemento Z,  $\sigma_{X_Z}$  é a seção eficaz de produção de radiação-X característica para o elemento Z e  $P_{L \rightarrow M}$  é a probabilidade de transição do nível L para o nível M no elemento Z.

A análise dos espectros de raios-X das amostras de osso e respetiva quantificação foi feita com o programa WinAXIL<sup>®</sup>, por um método comparativo (compare mode). Este é um método que se baseia em linhas de calibração com materiais de referência padrão, sendo ignorados os efeitos de matriz. Assume-se uma relação linear entre as intensidades dos raios-X característicos e as concentrações para cada elemento, desde que não hajam alterações significativas nos fatores de atenuação. Isto significa que a matriz dos materiais de referência padrão usados para calibração deverá ser semelhante à da amostra [139, 150].

# **Descrição das Instalações Experimentais**

---

As análises de PIXE e PIGE foram realizadas na linha de reações nucleares do acelerador Tandem de 3MV no LATR (Laboratório de Aceleradores e Tecnologias de Radiação) no CTN/IST. As análises de micro- fluorescência de raios-X foram realizadas no espectrômetro M4-Tornado da Bruker na FCT-UNL. Algumas amostras foram também analisadas na microsonda nuclear OM2000 (Oxford Microbeams® Ltd, UK) [148] instalada no acelerador Van de Graff no LATR-CTN/IST. Ao longo deste capítulo será feita uma descrição dos principais componentes e do funcionamento do acelerador tandem e do espectrômetro M4-tornado (Bruker, UK) [149]. Será também feita de forma resumida uma descrição da microsonda nuclear.

## 1. Acelerador Tandem

O acelerador Tandem é constituído pela fonte de iões, tubos de transporte onde está confinado o feixe, acelerador propriamente dito, gaiolas de Faraday onde é medida a intensidade de corrente do feixe, magnetos defletores (um antes do acelerador, e dois depois, o magneto de 90° e o magneto defletor para direccionar o feixe para a linha de reações nucleares), quadrupolos eletrostáticos, tripletos, dupletos, sistemas de colimadores e a câmara de reações nucleares onde estão colocados os vários detetores de radiação, conforme esquema da figura 17.



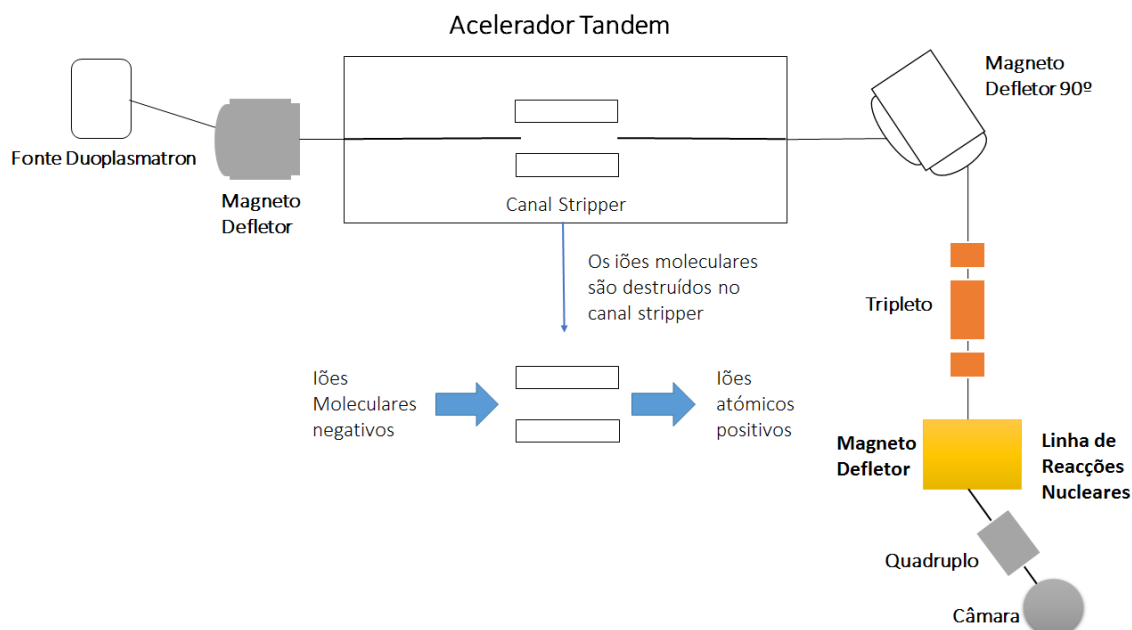


Figura 17) Instalação do acelerador tandem e linha de reações nucleares.

A fonte de íões é uma fonte *Duoplasmatron* que produz íões de hidrogénio negativos com intensidades até 30  $\mu\text{A}$ . A intensidade da corrente depende essencialmente das condições do filamento. O feixe de íões produzido na fonte encontra-se confinado no interior de tubos de transporte onde é acelerado, defletido e focado. O magneto defletor posicionado entre a fonte e o acelerador permite fazer uma melhor focagem e seleção do ião ou espécie molecular que entra no acelerador (seleção massa/carga). Para o caso dos íões hidrogénio a corrente no magneto é aproximadamente 1.5 A.

O acelerador tandem é um acelerador eletrostático de 3 MV produzido pela *High Voltage Engineering* (figura 18). O tanque do acelerador é preenchido por gás  $\text{SF}_6$  a alta pressão (6 bar) e contém uma fonte de alta tensão de *Cockcroft-Walton* de 3 MV que acelera o feixe e um canal de *stripper*, que é um alvo gasoso de árgon, com uma pressão de alguns mbar. O gerador de *Cockcroft-Walton* usa uma escada de circuitos de condensadores retificadores que funciona como um circuito multiplicador de tensão. O terminal de alta tensão cria um potencial elétrico positivo no centro do acelerador, onde se encontra o *stripper*, e faz com que os íões negativos sejam acelerados até ao centro do acelerador. Ao atravessarem este alvo gasoso os íões vão perder os eletrões fracamente ligados e as ligações moleculares são quebradas restando apenas íões monoatômicos positivos. No segundo estágio de aceleração os íões são acelerados pelo mesmo potencial positivo com energia dada por:

$$E = (q + 1)V \quad 3.1$$

Em que,  $q$  é a carga do ião acelerado e  $V$  é o potencial positivo criado no centro do acelerador em unidades de volt. No caso das análises das amostras ósseas, a energia escolhida para a análise de todas as amostras foi 2800 keV, o que corresponde a uma tensão aplicada no terminal de 1400 kV.



Figura 18) Acelerador Tandem de 3 MV do LATR/CTN-IST.

Ao atravessar o acelerador, após o segundo estágio de aceleração, o feixe é focado pelos quadrupolos eletrostáticos que estão à saída do acelerador. Depois passa por anteparos constituídos por 4 micrómetros (resolução = 0.005 mm) e uma chapa de tântalo, sendo a corrente medida numa gaiola de Faraday ou Faraday cup. É possível regular a abertura de passagem do feixe fazendo o ajuste dos micrómetros o que pode ser útil em exercícios em que a corrente com que se pretende fazer a análise seja muito baixa. O magneto de 90° faz o desvio do feixe que passa novamente por anteparos equivalentes aos anteriores e a corrente do feixe é controlada pela Faraday cup que se segue. O tripleto permite a focagem do feixe na linha. A seguir ao tripleto existe um sistema de colimadores constituído por uma chapa de tântalo com três furos com diâmetros 2, 5 e 3 mm e com um suporte para montagem de uma peça de quartzo (figura 19). Ajustando manualmente a posição desta peça de quartzo de modo que fique na direção do feixe e usando a câmara de vídeo é possível fazer uma focagem precisa do feixe usando os tripletos. Neste processo de focagem o magneto defletor que está colocado a seguir ao tripleto está desligado, visto que apresenta uma corrente residual que desvia o feixe. Depois, coloca-se manualmente no colimador que se pretende, e por norma ajusta-se para o furo com diâmetro de 3 mm. A corrente do feixe é medida na Faraday cup logo a seguir ao sistema de colimadores.



Figura 19) Chapa de tântalo que constitui o sistema de colimadores posicionados a seguir ao tripelho onde é possível ver o suporte de encaixe da peça de quartzo para focagem do feixe. Os colimadores têm 2, 5 e 3 mm de diâmetro [151].

A focagem do feixe com o magneto defletor permite desviar o feixe para a linha de reações nucleares. Embora não estando esquematizadas na figura 17 existem mais três linhas, a linha de micro- AMS, a linha de HR-PIXE e a linha para RBS, PIXE e PIGE para a fonte de partículas alfa. A focagem do feixe é feita por forma a que em cada ponto da zona de alta energia (após passagem do feixe pelo centro do acelerador) a corrente medida seja a mesma em todas as Faraday cups.

A câmara de reações nucleares onde são colocados os detetores de radiação funciona como uma Faraday cup. À entrada da câmara existe um colimador que consiste numa estrutura de um material plástico especialmente desenvolvido para vácuo. O material foi escolhido tendo em conta também que o sistema de colimadores deveria estar eletricamente isolado da câmara que, como referido, funciona como uma Faraday cup. Para proteção desta peça de plástico, existe uma chapa de níquel com uma abertura de 10 mm (figura 20). Na parte da peça mais junto à câmara é colocado um colimador de níquel com diâmetro de 3 mm. Para evitar que as riscas do níquel apareçam nos espetros gama, existe um segundo colimador, uma chapa de ouro com uma espessura de 0.5 mm. Assim sendo, a estrutura do colimador consiste na chapa de ouro com um diâmetro de 2 mm e uma chapa de níquel com um diâmetro de 3 mm (figura 21). Este colimador encontra-se ligado à massa. À saída do colimador foi necessário aplicar uma peça de alumínio em forma de degrau e com um furo perfeitamente centrado com o do colimador, para evitar problemas de carga devido à entrada de eletrões secundários na câmara.



Figura 20) Chapa de níquel que protege a peça de plástico à entrada da câmara [151].



Figura 21) Colimador de níquel e folha de ouro [151].

À volta da manga do detetor gama pode colocar-se uma chapa de chumbo com uma espessura de 2 mm para evitar o aparecimento das riscas provenientes dos raios-X K do ouro no espetro de radiação gama. O detetor de radiação gama e o detetor de raios-X são colocados  $130^\circ$  relativamente à direção do feixe. Existe uma estrutura dentro da câmara em forma de ‘roda dentada’ que permite colocar dois detetores de partículas em diferentes posições por forma a mudar o ângulo de deteção das partículas. É possível medir a corrente no colimador de níquel e no colimador de ouro o que é importante para focar o feixe no interior da câmara, o que pode ser bastante complicado. A melhor forma de focar o feixe consiste em tirar o feixe do colimador de níquel, e removê-lo tanto quanto possível da chapa de ouro. Uma melhor focagem pode ser feita colocando uma amostra de quartzo no interior da câmara, no porta-amostras, e utilizando a câmara de vídeo para visualização do feixe. Quando o feixe incide no alvo faz fluorescência com emissão de luz azul, e é por este motivo que é possível a focagem do feixe com recurso à câmara de vídeo. Isto é muito importante dado que para energias mais elevadas e para certos elementos podem ocorrer reações  $(p, n)$  com emissão de neutrões. Por exemplo o canal de neutrões para o lítio abre a uma energia bastante baixa, cerca de 1600 keV.

Os defletores eletrostáticos permitem orientar o feixe para o interior da câmara. Os quadrupolos (dupletos) permitem uma focagem do feixe antes de atingir o colimador e é fundamental para focar o feixe no interior da câmara. Durante a realização do plano de trabalhos foi necessário alinhar a linha de reações nucleares incluindo a câmara pois foi alterada a posição das lentes eletrostáticas para uma posição em que permitia uma melhor focagem do feixe no centro da câmara. Para tal foram utilizados um teodolito e uma mira colocada numa flange da câmara.

O detetor de radiação gama é um detetor de germânio ultra-puro, EG&G Ortec GEM-45190-P Ge(HP). O detetor entra na câmara através de uma manga e, para assegurar o isolamento elétrico com a câmara, a manga do detetor é revestida com uma película de mylar (6.3  $\mu\text{m}$  de espessura). O detetor é revestido com uma capa de alumínio com 1 mm de espessura. O cristal tem 64 mm de diâmetro e 62.6 mm de comprimento e uma camada inativa de 700  $\mu\text{m}$ . A resolução em energia e a eficiência intrínseca são 1.76 keV e 45%, respetivamente, para a linha de 1.332 MeV do  $^{60}\text{Co}$ , com uma constante de tempo de 6  $\mu\text{s}$ . Está posicionado a uma distância de 55.5 mm do alvo e a  $130^\circ$  relativamente à direção do feixe, como mencionado anteriormente. O detetor é arrefecido a azoto líquido.

O detetor de raios-X é um detetor Si-PIN com fotodíodo (modelo XR100CR da Amptek), arrefecido termoelectricamente. O amplificador está contido numa caixa metálica, a unidade PX2. À entrada do detetor existe uma janela de berílio com 25  $\mu\text{m}$  e o cristal, de formato paralelepípedo, tem uma área de  $25\text{mm}^2$  e 500  $\mu\text{m}$  de espessura. A resolução em energia para a linha de 5.9 keV do  $^{55}\text{Fe}$  é de 230 eV. O detetor está colocado a 31 mm do alvo. O funcionamento do detetor de raios-X foi testado com recurso a uma fonte radioativa de  $^{241}\text{Am}$ . Verificou-se que devido a um problema possivelmente eletrónico só era possível detetar raios-X com energias superiores a 2 keV, pelo que não foi possível quantificar o fósforo com esta técnica. A extremidade da manga onde é inserido o detetor de raios-X é revestida com uma folha de mylar de 6.3  $\mu\text{m}$  para ser possível manter as condições de vácuo no interior da câmara. Depois de montado o detetor de raios-X e de estabelecidas as devidas ligações eletrónicas à unidade PX2 que inclui o sistema de amplificação, o controlo do efeito Peltier e a alta tensão, foram analisados vários alvos com elementos traço em concentrações conhecidas (*corning standards*), um alvo com concentrações conhecidas de três elementos metálicos e pastilhas de materiais de referência padrão certificados para vários elementos, para verificação do funcionamento e validação da técnica para as análises pretendidas. Estes resultados serão apresentados no capítulo 6.

Durante as análises das amostras ósseas foi necessário usar o canhão de eletrões para evitar descargas sob a forma de faíscas. O canhão de eletrões é constituído por um filamento condutor, neste caso em particular utilizou-se um filamento de tungsténio, e uma grelha de extração. O filamento quando é percorrido por uma corrente elétrica emite eletrões por efeito termoelétrico. Se a grelha de extração estiver polarizada positivamente e estiver posicionada entre o filamento e o alvo faz com que parte destes eletrões seja acelerada para a superfície do alvo. Se o número destes eletrões for suficientemente elevado, a superfície do alvo isolante deixa de ter um campo elétrico irregular. Basicamente a criação destes eletrões faz com que o

campo fique homogêneo e a carga passe a ser escoada sem ocorrência de faíscas. As fontes de alimentação para o canhão de elétrons foram construídas por Mateus et al [142] e fornecem uma corrente até 300 mA ao filamento e um potencial até 300 V para polarização da grelha de extração.

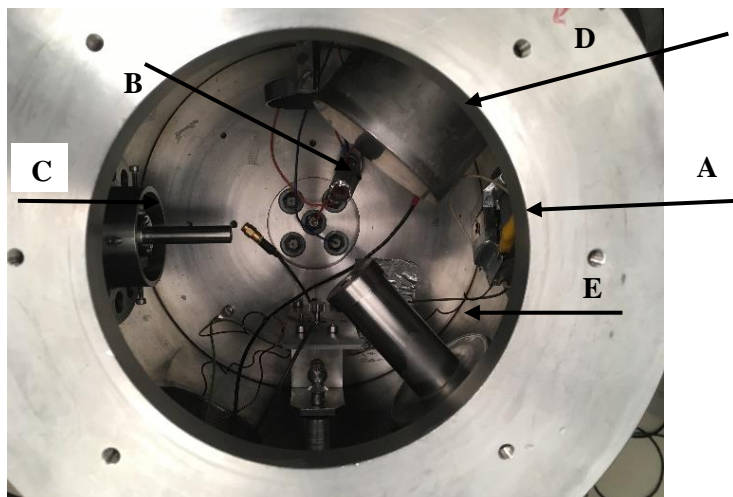


Figura 22) Interior da câmara em que é possível ver a (A) estrutura em forma de ‘degrau’ colocada em frente ao sistema de colimadores, o (B) canhão de elétrons e (C) uma estrutura colocada atrás do porta-amostras, o *beam stopper*, que para o feixe em análises de alvos finos. É também possível ver o (D) detector de radiação gama e (E) a manga do detector de raios -X.

O sistema de vácuo da linha (figura 23) está dividido em dois estágios. No primeiro segmento o vácuo é assegurado por uma bomba rotatória e por uma bomba turbomolecular da *Pfeiffer*. No segundo segmento é utilizada uma bomba rotatória para fazer vácuo primário e uma bomba turbomolecular da *Varian* para estabelecimento do alto vácuo. No primeiro estágio para medição das condições de vácuo existem medidores *Pirani* (modelo PRL10 P021-58-000) e *Penning* (modelo, CP25-S P145-33-000) da *Edwards*, respetivamente. O medidor da câmara é da também da marca *Edwards* e permite medir tanto o vácuo primário como o alto vácuo. Na câmara a pressão habitual é de  $1 \times 10^{-7} \text{ mbar}$ . Entre o terminal de alta energia do acelerador e o magneto de  $90^\circ$  está montada uma bomba criogénica para assegurar melhores condições de vácuo na linha.

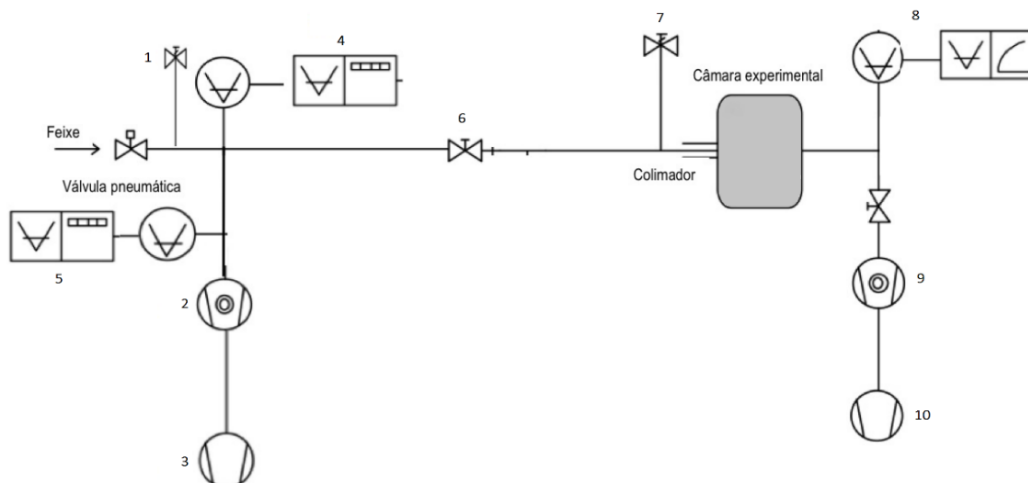


Figura 23) Sistema de Vácuo da Linha de Reações Nucleares. Legenda: (1) Válvula Manual – permite a ligação de uma bomba rotatória caso seja necessário restabelecer o vácuo primário da linha, permitindo também a entrada de ar; (2) Bomba Turbomolecular da *Varian* com capacidade de bombeamento de 250 l/s; (3) Bombas rotatórias da *Varian*; (4) Medidor Pirani; (5) Medidor Penning; (6) Válvula manual; (7) Válvula manual onde é possível fazer entrar ar na câmara e ligar a bomba rotatória para fazer o vácuo primário; (8) Medidor Penning; (9) Bomba turbomolecular da *Pfeiffer* com capacidade de bombeamento de 100 l/s; (10) Bombas rotatórias da *Pfeiffer*.

## A. Procedimentos experimentais no acelerador tandem

- **Filamento da Fonte de Iões**

Durante este trabalho foi várias vezes necessário fazer um novo revestimento para o filamento da fonte Duoplasmatron, de acordo com os procedimentos que se seguem:

- Limpeza da malha de platina (filamento) com água régia que se prepara no momento com HCl e HNO<sub>3</sub> numa proporção 3:1 (figura 24);
- Lavagem do filamento com água;
- Depois do filamento seco, mergulha-se a malha numa mistura de carbonato de bário + butil acetato numa proporção 2:1;
- Aquece-se o filamento com o maçarico até ficar com uma tonalidade vermelha;
- Após ter arrefecido, mergulha-se novamente a malha na mistura de carbonato de bário com butil acetato.
- Por fim, seca-se o filamento com ar frio.



Figura 24) Malha de platina do filamento após limpeza com água-régia [151].

- **Calibração em Energia do Acelerador**

Durante a realização do projeto de doutoramento foi necessário fazer a calibração em energia do acelerador. Várias são as técnicas que podem ser usadas, sendo as mais comuns a utilização de ressonâncias com energias bem conhecidas e limiares de energia de reações de Q negativo. A calibração efetuada baseou-se em várias ressonâncias com alvos finos e espessos. Foram escolhidas as ressonâncias bem conhecidas das reações  $^{19}\text{F}(p, \alpha\gamma)\text{O}^{16}$  ( $E_R = 672$  keV,  $\Gamma = 6$  keV,  $E_\gamma = 6125$  keV; 872 keV,  $\Gamma = 4$  keV,  $E_\gamma = 6125$  keV; 1371 keV, largura da ressonância,  $\Gamma = 6$  keV e  $E_\gamma = 6125$  keV),  $^{23}\text{Na}(p, p'\gamma)\text{Na}^{23}$  ( $E_R = 1645.1$  keV, largura da ressonância,  $\Gamma = 8$  keV e  $E_\gamma = 440$  keV),  $^{27}\text{Al}(p, \gamma)\text{Si}^{28}$  ( $E_R = 992$  keV, largura da ressonância,  $\Gamma = 0.1$  keV e  $E_\gamma = 1779$  keV) para alvo fino e para alvo grosso e  $^{16}\text{O}(p, p)\text{O}^{16}$  ( $E_R = 3470$  keV,  $\Gamma = 1.5$  keV e  $E_\gamma = 1779$  keV). A figura 25 mostra algumas destas ressonâncias medidas.



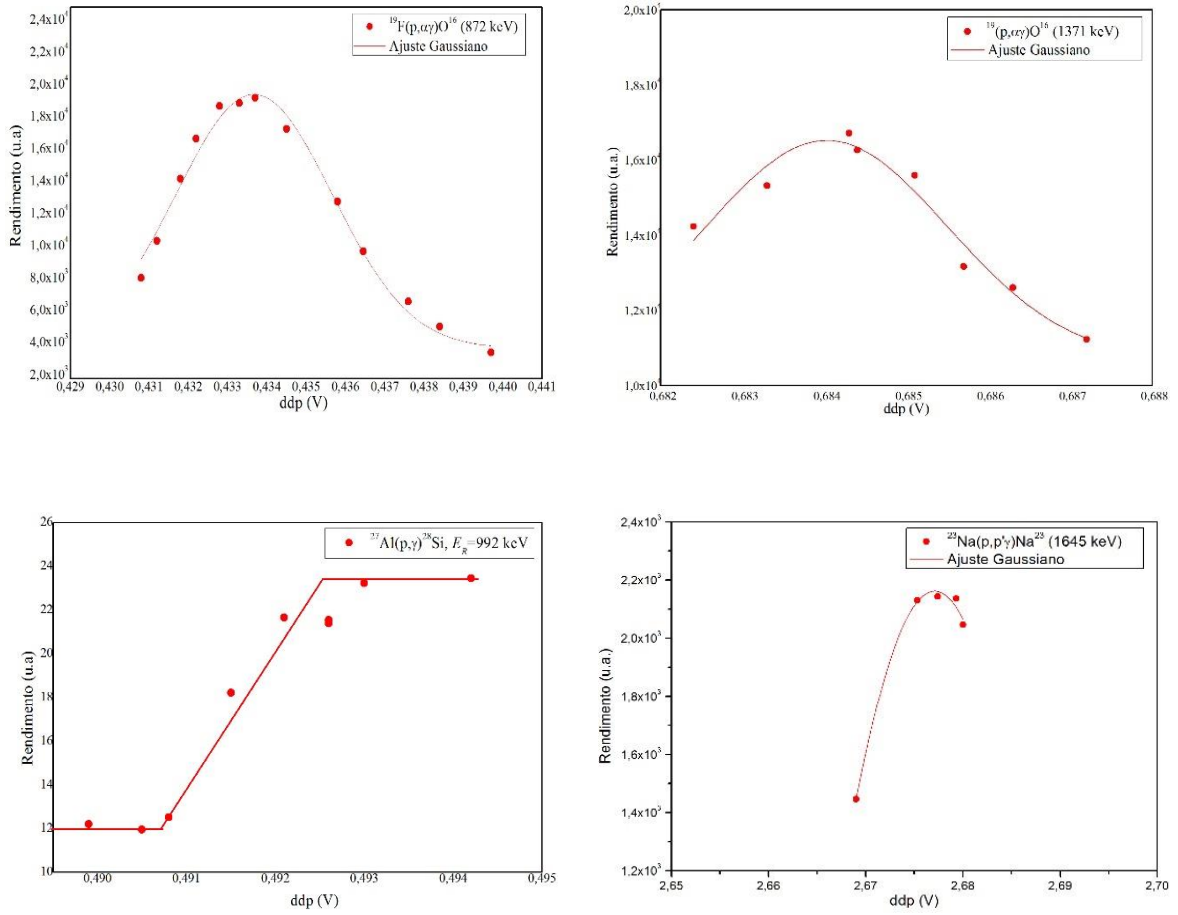


Figura 25) Dados experimentais e ajustes para as ressonâncias  $^{19}\text{F}(p, \alpha\gamma)\text{O}^{16}$  (872 e 1371 keV),  $^{27}\text{Al}(p, \gamma)\text{Si}^{28}$  (992 keV) e  $^{23}\text{Na}(p, p'\gamma)\text{Na}^{23}$  (1645.1 keV).

A largura experimental  $\Gamma'$  e a largura natural  $\Gamma$  de uma ressonância estão relacionadas através da expressão:

$$\Gamma' = \sqrt{\Delta E^2 + \Gamma^2} \quad 3.2$$

Onde,  $\Delta E$  é a perda de energia das partículas do feixe incidente no alvo. Utilizando estas expressões, e sendo conhecidos os valores das larguras naturais e as energias teóricas das ressonâncias referidas foi possível calcular, a energia das ressonâncias, a partir da expressão aproximada  $E_R = E - \frac{\Delta E}{2}$ , em que E é o valor experimental correspondente ao máximo da ressonância. Os valores encontram-se na tabela 2. A reta de calibração do acelerador encontra-se representada na figura 26.

<b>ddp (kV)</b>	<b>Energia da Ressonância (keV) Teórica</b>	<b>Energia da Ressonância (keV) Experimental</b>
330.0	672.0	670.4
433.5	875.6	876.4
491.5	992.0	991.8
684.4	1374.3	1375.7
819.9	1645.0	1645.3
963.7	1931.0	1931.5
1021.0	2046.0	2045.5
1736.7	3470.0	3469.8

Tabela 2) Resultados das energias das ressonâncias obtidas experimentalmente para cada valor de diferença de potencial (ddp). A energia da ressonância experimental é a que se obtém utilizando a equação da reta indicada no gráfico de ajuste linear da figura 26.

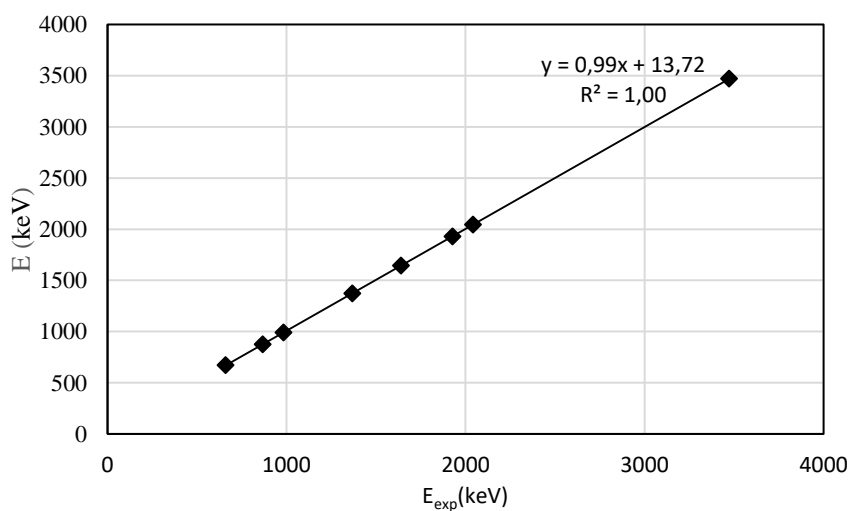


Figura 26) Reta de calibração em energia do acelerador tandem obtida experimentalmente.

## 2. M4 – Tornado

As análises de  $\mu$ -XRF foram feitas num espectrómetro comercial na FCT/UNL, o M4 – Tornado (Bruker, UK). Qualquer espectrómetro de raios-X é constituído genericamente por uma fonte de raios-X usada para irradiar a amostra (pode ser um tubo de raios-X, uma fonte radioativa ou radiação de sincrotrão), amostra e detetor de raios-X (figura 27).

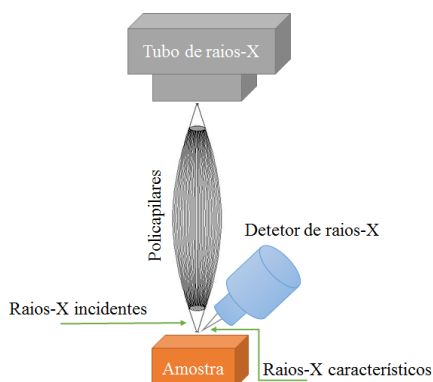


Figura 27) (a) Esquematização da geometria de excitação e de deteção do espectrómetro M4 -Tornado; (b) Espectrómetro M4-Tornado (Bruker, UK) [152].

O tubo de raios-X do tornado é de baixa potência com sistema de refrigeração por ar e é constituído por um filamento de tungsténio e um ânodo de ródio. Ao passar uma corrente elétrica através do filamento, são emitidos eletrões, que são acelerados desde o cátodo polarizado com tensão negativa em direção ao ânodo (polarização positiva). Os eletrões são acelerados como resultado da aplicação de tensão no tubo (figura 28). A desaceleração dos

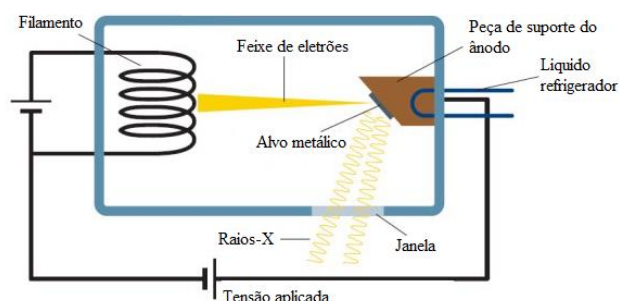


Figura 28) Esquematização do funcionamento do tubo de radiação [153].

eletrões quando estes atingem o ânodo forma um espectro contínuo de raios-X (*bremsstrahlung*). Sobrepostos a este fundo contínuo estão os raios-X característicos resultantes da fluorescência do material do ânodo, neste caso do ródio ( $K_{\alpha 1} = 20.216 \text{ keV}$ ,  $K_{\beta 1} = 22.724 \text{ keV}$ ,  $L_{\alpha 1} = 2.697 \text{ keV}$  e  $L_{\alpha 2} = 2.834 \text{ keV}$ ). No entanto, as riscas L são absorvidas na

janela à saída do tubo. A forma, a intensidade e a energia máxima do espectro contínuo depende do valor da tensão aplicada no tubo, enquanto que a posição das linhas características depende

do material do ânodo. O espectro característico só é possível ser observado se a tensão aplicada for superior à tensão crítica,  $V_c$ , correspondente à energia de ligação dos eletrões nos elementos do ânodo. A intensidade das linhas características é proporcional à corrente do tubo e é função da tensão aplicada, de acordo com a expressão:

$$I' = Ci'(V - V_c)^\gamma \quad 3.2$$

Onde,  $C$  é uma constante,  $i'$  é a corrente aplicada no tubo e  $\gamma$  é uma constante que depende da linha emitida e está normalmente compreendida entre 1.5 e 2. A radiação contínua pode variar de 0 até à energia cinética dos eletrões que atingem o alvo. Assim, a forma do espectro contínuo depende apenas da energia dos eletrões acelerados e não da natureza do alvo. Se a temperatura do filamento variar, mantendo-se a tensão constante, a intensidade do feixe aumenta visto que são produzidos mais eletrões por efeito termoiónico. A intensidade total do espectro contínuo aumenta com o número atómico do material do ânodo e com a tensão aplicada [153].

A parte decrescente da distribuição espectral na zona de baixas energias deve-se à absorção dos raios-X na janela de saída do tubo.

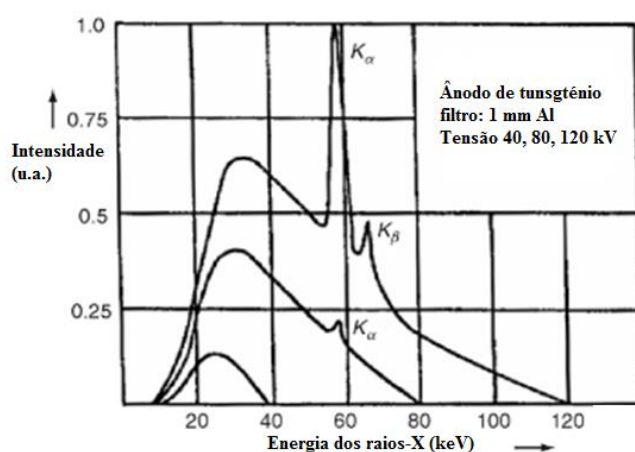


Figura 29) Espectro típico de um tubo de raios-X com um ânodo de tungsténio [154].

O M4-tornado permite a aplicação de uma tensão até 50 kV e correntes até 600  $\mu$ A no tubo de raios-X, sendo a potência máxima 30 W. O feixe passa depois por um colimador de zircónio havendo a possibilidade também de serem usados filtros. Este espectralómetro está equipado com cinco filtros diferentes: Al - 12.5  $\mu$ m, Al - 100  $\mu$ m, Al - 630  $\mu$ m, Al/Ti - 100/25  $\mu$ m e Al/Ti/Cu - 100/50/25  $\mu$ m. Estes filtros estão posicionados entre o tubo de raios-X e a amostra, sendo denominados filtros primários, pois modificam o espectro de raios-X que sai do tubo ao qual a amostra vai ser exposta. O filtro actua no sentido de reduzir a radiação de fundo dispersa na região de interesse e para reduzir a intensidade de excitação dos picos de baixa

energia. As características do filtro são definidas pela curva de absorção dos raios-X que é controlada pela seleção do material e da espessura do filtro [154].

Este equipamento inclui uma ótica de policapilares que permite focar o feixe de raios-X até aos 25  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Os policapilares, estruturas desenvolvidas no final da década de 80 no instituto I. V. Kurchatov em Moscovo, consistem em arranjos de tubos de vidro de diâmetro muito reduzido com uma ligeira curvatura relativamente ao eixo longitudinal (figura 30). A focagem dos raios-X resulta das múltiplas reflexões nas paredes dos tubos capilares. As reflexões ocorrem na fronteira entre meios com diferentes índices de refração quando os raios-X atingem o vidro refletor com um ângulo rasante inferior a um ângulo crítico empiricamente determinado. Se a curvatura longitudinal dos capilares está abaixo de um certo limite, muitos raios-X divergentes podem ser refletidos da superfície interior dos tubos segundo um ângulo inferior ao ângulo crítico e serem efetivamente transportados ao longo dos tubos capilares. Quando os raios-X incidem com um ângulo que é superior ao ângulo crítico, estes raios-X vão ser refratados através da superfície dos tubos de vidro [152].

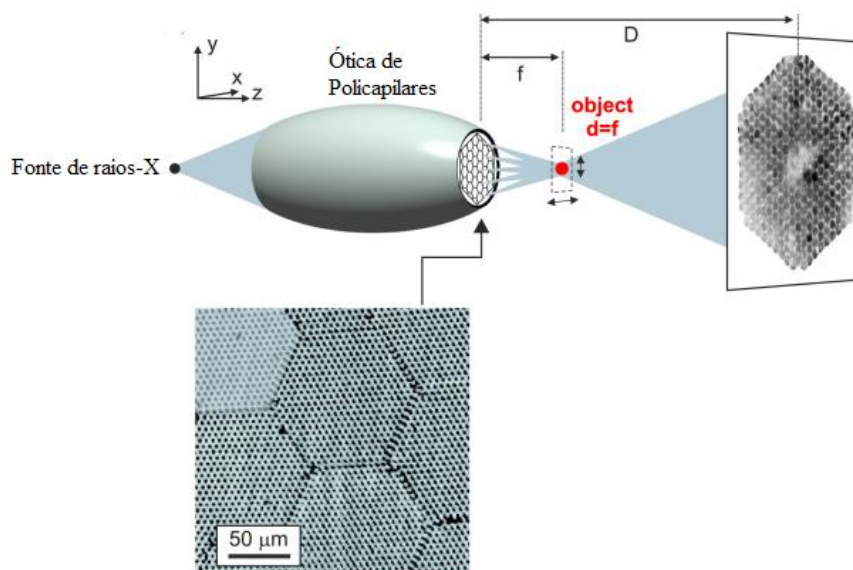


Figura 30) Sistema de policapilares utilizados para focar o feixe de raios-X em técnicas de micro-fluorescência de raios-X [155].

A deteção dos raios-X é feita por um detetor SDD (*Silicon Drift Detector*) dispersivo em energia termoelectricamente arrefecido com 30  $\text{mm}^2$  de área ativa e com resolução em energia de 142 eV para a risca  $K_{\alpha}$  do Mn. Permite detetar fótons numa gama de energias entre 1 e 60 keV e tem uma constante de tempo de 2-4  $\mu\text{s}$ . Ao contrário do detetor Si-PIN usado nas análises

PIXE, o detetor SDD é constituído por um ânodo muito pequeno rodeado por uma série de elétrodos. É um detetor cilíndrico simétrico, o ânodo é um pequeno círculo e os elétrodos são anulares. Quando um fóton de raios-X incide no material do detetor, são formados pares eletrão-lacuna. A energia para formação da lacuna depende do material do detetor,  $E_L$ . O número de pares eletrão lacuna formados depende da energia do fóton incidente  $E^x$ , sendo dado por,  $E^x/E^L$ . Os eletrões são coletados num elétrodo e a corrente resultante é proporcional ao número de pares eletrão-lacuna que está diretamente relacionado com a energia dos raios-X [152].

As amostras são colocadas numa plataforma com dimensões  $600 \times 350 \times 260 \text{ mm}$  e que se move no plano x-y-z. O posicionamento da amostra é conseguido através de um microscópio com amplificação  $10\times$  e  $100\times$ . Este sistema permite que as amostras sejam posicionadas junto do sistema de policapilares e que seja possível escolher as áreas da amostra onde a análise vai ser feita. As análises são normalmente feitas com um vazio na ordem dos 20 mbar assegurado por uma bomba de vácuo primário.

### 3. Microsonda Nuclear

Várias técnicas de análise por feixes de íões, nomeadamente PIXE, RBS, PIGE e STIM, podem ser realizadas nas instalações da microsonda nuclear do CTN/IST [124]. A microsonda nuclear instalada no LATR-CTN/IST foi desenvolvida pela *Oxford Microbeams* (UK) [148]. É constituída pelo triplo de lentes quadrupolares (lentes OM50) e respetiva mesa de ajuste (precisão de ajuste vertical e horizontal de 5  $\mu\text{m}$  e ajuste de rotação de 50  $\mu\text{rad}$ ), pelo sistema dipolar magnético de varrimento de feixe (amplitude de varrimento 2.6 mm para prótons de 2 MeV), o corpo principal da câmara que apresenta uma configuração octogonal e pelos vários dispositivos que constituem a componente eletrónica (fontes de alimentação dos quadrupolos, fonte de potência do sistema de varrimento e unidades de eletrónica para controlo e aquisição de dados associada a *software* de exploração dos vários sistemas e apresentação de resultados). A microsonda nuclear está instalada numa das linhas do acelerador Van de Graaff de 2.5 MeV. O acelerador Van de Graff permite a produção de feixes de  $H^+$ ,  $H_2^+$ ,  $H_3^+$  e  $He^{2+}$ , embora na maioria dos trabalhos realizados sejam utilizados feixes de prótons e de partículas alfa. Para além da linha da microsonda nuclear, existem mais duas, e o feixe é encaminhado para as várias linhas por deflexão no magneto de 25° posicionado logo a seguir ao acelerador. Na figura 31 é apresentado um esquema da linha experimental onde está instalada a microsonda nuclear com indicação dos vários componentes instalados.

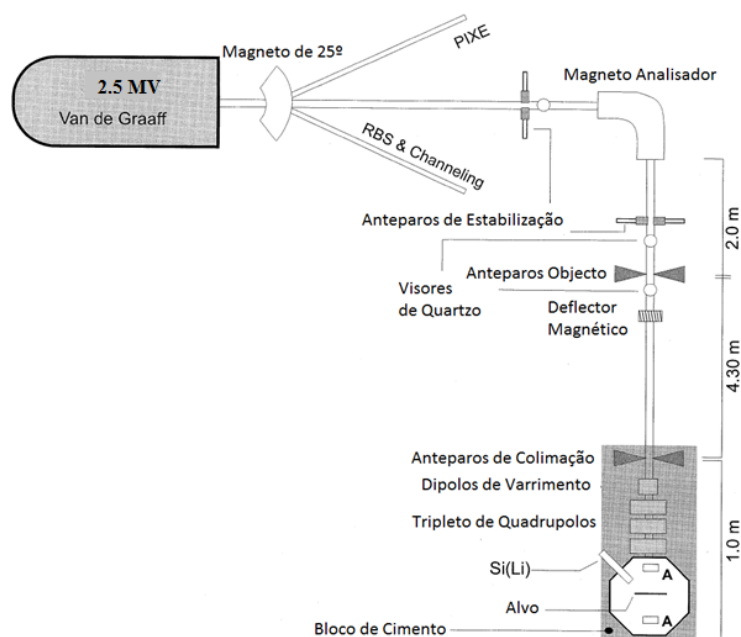


Figura 31) Esquematização da linha de PIXE e microsonda nuclear do laboratório de feixes de íões do LATR-CTN/IST [124].

Como se pode ver na figura 31, a linha experimental onde está instalada a microsonda nuclear inclui o magneto de 90°. Os anteparos objeto e os de colimação são ambos constituídos por cilindros de WC carboneto de tungsténio (dimensões de  $\phi=4\text{mm}$  e  $L=12\text{mm}$ ) da *Technishes Büro S. Fischer*. O ajuste mecânico é efetuado com recurso a micrómetros com precisão de 1  $\mu\text{m}$  para os anteparos objeto e com precisão de 10  $\mu\text{m}$  para os anteparos de colimação. Os anteparos de colimação, dipolos de varrimento, tripleto de lentes e câmara experimental e equipamento associado estão acoplados a uma extensa placa de aço inoxidável e este conjunto por sua vez está fixo a um bloco de cimento ( $\approx 1400\text{ kg}$ ), colocado no solo em cima de uma camada de cerca de 10 mm de poliestireno expandido, no sentido de amortecer as vibrações do solo as quais têm consequências na resolução espacial do feixe. Os anteparos objeto também são suportados por blocos de cimento, mas de menores dimensões (200 kg), assentes também numa placa de poliestireno expandido. Ao longo da linha estão dispostos visores de quartzo que permitem a visualização do feixe e uma melhor focagem e transmissão do mesmo. A corrente do feixe pode também ser medida nestes visores, o que permite otimizar a razão entre o feixe gerado e o feixe transmitido. Logo a seguir aos anteparos objeto está o deflector eletromagnético que tem como função essencial a otimização da transmissão do feixe através dos anteparos de colimação. Os anteparos de colimação por sua vez têm como função delimitar a entrada do feixe no sistema de lentes o que é importante para minimização de aberrações do sistema de lentes. Nas figuras 32 e 33 é apresentada uma fotografia do bloco terminal da microsonda e do interior da câmara onde são colocadas as amostras e onde são implementados os detetores. A câmara tem capacidade para 8 detetores [163].

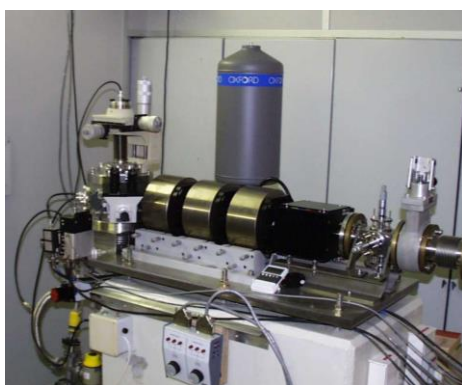


Figura 32) Fotografia do bloco terminal da microsonda nuclear da Oxford Microbeams [148].

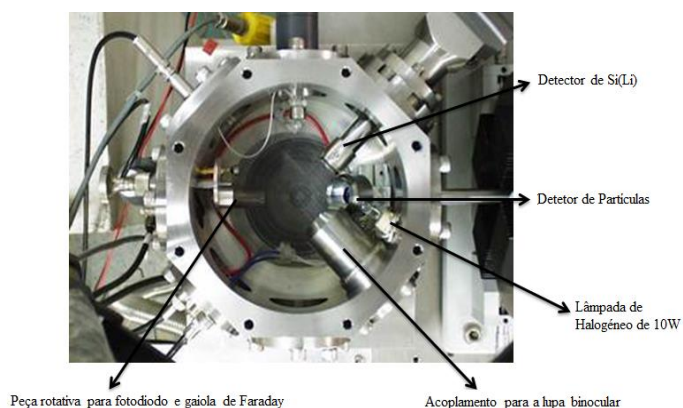


Figura 33) Interior da câmara experimental da microsonda nuclear.



A câmara experimental é dotada de um manipulador x, y, z para posicionamento das amostras e de uma lupa binocular colocada a 45° relativamente à direção do feixe. Ao manipulador pode ser acoplado um porta-amostras fixo ou um goniómetro de um eixo com rotação segundo o eixo vertical. No porta-amostras fixo podem ser colocadas amostras com faces de dimensões máximas 2 × 4 cm e espessura até 2 cm. O feixe incide na amostra segundo a normal à sua superfície. No goniómetro as amostras deverão ter dimensões de 1 × 4 cm e espessura de 1 cm. A lupa binocular com ampliação regulável de 10× - 135× e distância de trabalho de 62 mm (com objetiva de 1.5×) auxilia na focagem do feixe e no posicionamento das amostras. Para análises PIXE o detetor utilizado é um detetor de SDD da *Bruker* com 30 mm<sup>2</sup> de área ativa, o qual é posicionado a 135° relativamente à direção do feixe (geometria IBM). Consoante o que se pretende medir, podem ser utilizados vários filtros de raios-X. A normalização dos espectros de raios-X obtidos é efetuada em geral com recurso à medida da carga depositada pelo feixe na amostra e/ou câmara experimental. Para amostras espessas, como é o caso das amostras de osso, o porta-alvos está devidamente isolado do resto da câmara e a carga é medida diretamente no alvo. Para amostras finas, é aplicado um cilindro oco de grafite na mesma peça mecânica que suporta o fotodiodo que funciona como uma gaiola de Faraday. Os detetores de partículas são detetores PIPS (*Passivated Implanted Planar Silicon*) colocados 140° relativamente à direção do feixe (geometria Cornell). O sistema de vácuo é assegurado por um conjunto constituído por uma bomba difusora e uma bomba rotatória.



# **Medição da Secção Eficaz da Reação $^{31}\text{P}(\text{p},\text{p}'\gamma)^{31}\text{P}$**

---

# Introdução e Revisão da Literatura

---

O fósforo é um dos elementos que está presente em todas as amostras biológicas e que faz parte da componente mineral do osso desempenhando funções essenciais no metabolismo ósseo, conforme referido anteriormente. As análises das amostras ósseas na câmara de reações nucleares, sobretudo para verificar a presença de elementos leves como o sódio, o flúor e o magnésio revelou que era possível observar claramente a radiação gama proveniente de uma reação nuclear de dispersão inelástica pelo fósforo. No entanto, a quantificação por PIGE sem recurso a padrões só é possível se for conhecida a secção eficaz. Assim sendo, foram envidados esforços no sentido de preparar um alvo fino de fósforo e foi medida a secção eficaz para a reação  $^{31}\text{P}(\text{p},\text{p}'\gamma)^{31}\text{P}$  para o canal de saída  $\gamma_1 = 1266 \text{ keV}$  para energias entre os 2 e os 4 MeV. Dado que a secção eficaz foi medida com espaçamento de 5-10 keV entre pontos, foi possível identificar outros estados excitados do núcleo composto que não estão descritos na literatura.

A informação acerca da função de excitação da reação de dispersão inelástica  $^{31}\text{P}(\text{p},\text{p}'\gamma)^{31}\text{P}$  para energias acima de 2 MeV é escassa na literatura e, até recentemente, a única secção eficaz disponível era a de *Boni et al* [156] de 1988. Estes autores mediram a secção eficaz para a gama de energias 2.6 – 3.8 MeV para o ângulo  $\theta_{\text{Lab}} = 90^\circ$  usando um alvo que consistia em  $125 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de GaP evaporados num filtro *Nuclepore*. Mais recentemente e no âmbito de um projeto com a Agência Internacional de Energia Atómica (IAEA, *International Atomic Energy Agency*) no qual o nosso grupo também participou, *Jokar et al.* mediram a secção eficaz da referida reação para a gama de energias 1886 – 3007 keV para  $\theta_{\text{Lab}} = 90^\circ$  e usaram um alvo fino de  $\text{Zn}_3\text{P}_2$  evaporado num filme de carbono *self-supporting* [157]. Na literatura estão também disponíveis quatro conjuntos de dados para rendimentos de radiação gama para alvos grossos para o intervalo de energias 1.75 – 2.56 MeV [158], 2.2 - 4.1 MeV [159], 2.4 – 4.2 MeV [160] e 1.7 – 2.4 MeV [161].

# Preparação e Caracterização do Alvo

---

O alvo analisado foi preparado por evaporação de 20 mg de fosfato de cálcio sobre um alvo fino de prata. Os alvos finos de prata foram previamente preparados por evaporação de 50 mg de prata sobre lâminas de vidro previamente recobertas com detergente RBS 25. Após evaporação, as lâminas são mergulhadas em água tépida numa tina e o filme de prata descola da superfície da lâmina sendo depois removido da água com um porta-amostras por forma a cobrir perfeitamente o furo central do porta-amostras sem rasgar ou desfazer-se.

Os alvos foram depois analisados por RBS (*Rutherford Backscattering Spectrometry*) nas instalações do acelerador Van de Graaff com um feixe de  $^4\text{He}^+$  com energia 2000 keV. Na técnica de RBS os iões incidentes são elasticamente dispersos pelos núcleos do alvo com uma energia característica da massa da partícula atingida. A deteção dos iões retrodispersos através dos detetores de partículas constitui o espectro de RBS sob a forma de contagens por número de canal e dá informação acerca da composição do alvo e do perfil de concentração dos elementos em profundidade. Existem três grandezas que são fundamentais em quantificação por RBS, o fator cinemático, a secção eficaz de Rutherford e o poder de paragem. No espectro, cada elemento presente no alvo aparece como um pico de topo achatado. A largura dos picos relaciona-se com a perda de energia dos iões incidentes no material. O fator cinemático,  $K$ , é dado pelo quociente entre a energia do ião retrodisperso,  $E_r$ , e a energia do feixe incidente,  $E_0$ ,

$$K = \frac{E_r}{E_0} \quad 4.1$$

O fator cinemático depende das massas do ião incidente e da partícula alvo e do ângulo de dispersão e é dado pela seguinte expressão:

$$K = \left[ \frac{(M_2^2 - M_1^2 \sin^2 \theta)^{\frac{1}{2}} + M_1 \cos \theta}{M_1 + M_2} \right]^2 \quad 4.2$$

Onde  $\theta$  é o ângulo de dispersão no referencial laboratório e  $M_1$  e  $M_2$  são as massas do ião incidente e da partícula alvo, respetivamente (figura 34). Os parâmetros  $M_1$ ,  $E_0$  e  $\theta$  são normalmente conhecidos, sendo assim possível identificar o núcleo dispersor ( $M_2$ ).

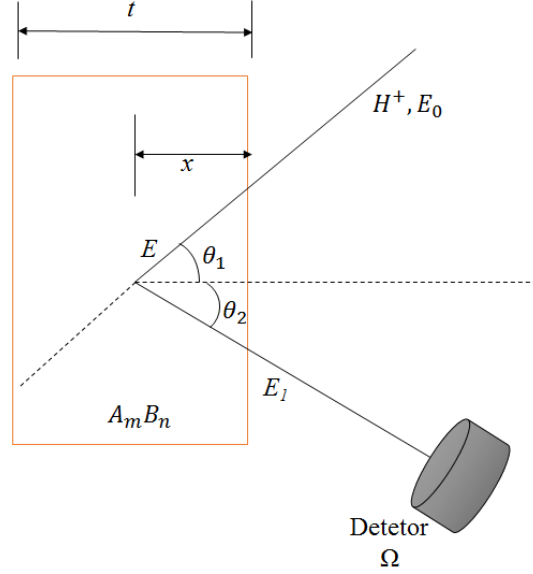


Figura 34) Esquema da geometria de detecção em análises RBS.

Para as energias do feixe nas análises por RBS a interação entre o ião incidente e o núcleo alvo é puramente Coulombiana. Nestes casos a secção eficaz  $\sigma_i(E, \theta)$  é determinada a partir da expressão,

$$\sigma_R(E, \theta) = \left( \frac{Z_1 Z_2 e^2}{4E} \right)^2 \times \frac{4 \left[ (M_2^2 - M_1^2 \sin^2 \theta)^{\frac{1}{2}} + M_2 \cos \theta \right]^2}{M_2 \sin^4 \theta (M_2^2 - M_1^2 \sin^2 \theta)^{\frac{1}{2}}} \quad 4.3$$

Onde  $(Z_1, e)$  e  $(Z_2, e)$  são as cargas dos núcleos incidentes e retrodispersos, respetivamente. Analisando a expressão 4.3 verifica-se que a secção eficaz aumenta com o quadrado do número atómico dos núcleos do alvo pelo que a técnica é mais sensível para a análise de elementos mais pesados. Realça-se também a dependência da secção eficaz com  $1/E^2$  e com  $1/\sin^4 \frac{\theta}{2}$ . A secção eficaz medida obtém-se por integração da equação 4.3 sobre todo o ângulo sólido do detetor,  $\Omega$  e é dada em unidades de *barn*. O rendimento diferencial do sinal em energia associado ao processo de dispersão de um ião por um determinado núcleo a uma profundidade  $x$  é dado por:

$$Y(E_x) = \frac{Q}{e} \sigma(E(x), \theta) \Omega N(x) dx \quad 4.4$$

Em que,  $\frac{Q}{e}$  é uma medida do número dos iões incidentes,  $\sigma(E(x), \theta)$  é a secção eficaz média e  $N(x)dx$  é a densidade superficial do núcleo dispersor à profundidade  $x$ . As partículas carregadas ao entrarem no detetor cedem toda a sua energia para a formação de pares eletrão-lacuna na camada ativa do detetor pelo que é assumido que a eficiência intrínseca destes

detetores é 100%, motivo pelo qual este parâmetro não é contabilizado na equação 4.4. A integração da equação 4.4 para todo o percurso do ião no interior do alvo dá o rendimento total de retrodispersão. Ao penetrarem no alvo os iões perdem energia durante o seu percurso no interior da amostra, pelo que a energia dos iões que são retrodispersos só pode ser determinada se for contabilizada a perda de energia que ocorre antes e depois da colisão e a energia que os iões cedem aos núcleos com os quais interagem.

O espectro que se obteve da análise de RBS do alvo de fosfato de cálcio está representado na figura 35. A análise foi feita com um feixe de  $\text{He}^+$  com energia 2000 keV, para um ângulo de  $140^\circ$ . O ajuste do espectro foi feito com recurso ao programa SIMNRA [162] considerando que o alvo tem duas camadas, uma primeira com espessura de  $275 \times 10^{15}$  átomos/cm<sup>2</sup> com 20% de fósforo e 80% de oxigénio e uma outra camada de prata com espessura  $410 \times 10^{15}$  átomos/cm<sup>2</sup>. O ajuste do espectro foi feito também com recurso ao programa WiNDF e os resultados obtidos estão em total acordo com os apresentados. A estabilidade do alvo foi verificada por análise do alvo nas mesmas condições antes e após as medidas da secção eficaz.

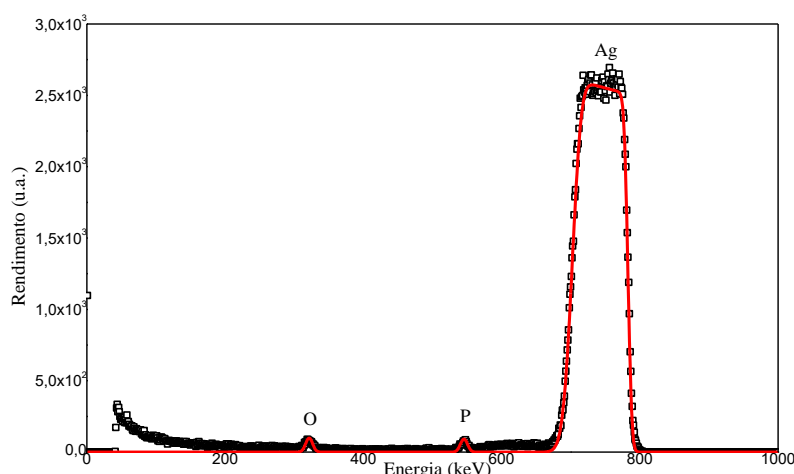


Figura 35) Ajuste do espectro de RBS do alvo de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  com o programa SIMNRA.

## Condições Experimentais

As medidas da seção eficaz foram feitas na linha de reações nucleares do acelerador tandem no LATR-CTN/IST. A seção eficaz foi medida com um feixe de prótons com energias compreendidas entre os 2 e os 4 MeV. A corrente do feixe no alvo era cerca de 100 nA. A radiação gama foi detetada pelo detetor de Ge(HP) colocado  $130^\circ$  relativamente à direção do feixe. As partículas elasticamente dispersas pela amostra foram também coletadas com recurso a um detetor PIPS com  $50 \text{ mm}^2$  de área ativa,  $100 \text{ }\mu\text{m}$  de camada de depleção e resolução nominal de 15 keV colocado a  $155^\circ$  relativamente à direção do feixe. O produto do ângulo sólido do detetor e a eficiência, que constitui a chamada eficiência absoluta, para o detetor de radiação  $\gamma$ , foi determinada com recurso a fontes calibradas em eficiência de  $^{133}\text{Ba}$ ,  $^{56}\text{Co}$  e  $^{152}\text{Eu}$ , colocadas na posição do alvo. O detetor de partículas tem eficiência intrínseca de 100% e o seu ângulo sólido foi determinado com precisão de 1%, medindo a abertura de colimação e a distância do alvo ao detetor por meios óticos. O valor do ângulo sólido é de  $3.65 \times 10^{-3} \text{ sr}$ . Para evitar as grandes incertezas associadas às medidas absolutas do número de prótons incidentes (carga coletada do feixe) e da espessura do alvo, foi medido o rendimento de partículas retrodispersas de um componente pesado do alvo, neste caso da prata para obter o produto das duas variáveis. A figura 36 mostra o espectro de radiação gama produzida quando se bombardeia o alvo com prótons com energia de 3.1 MeV.

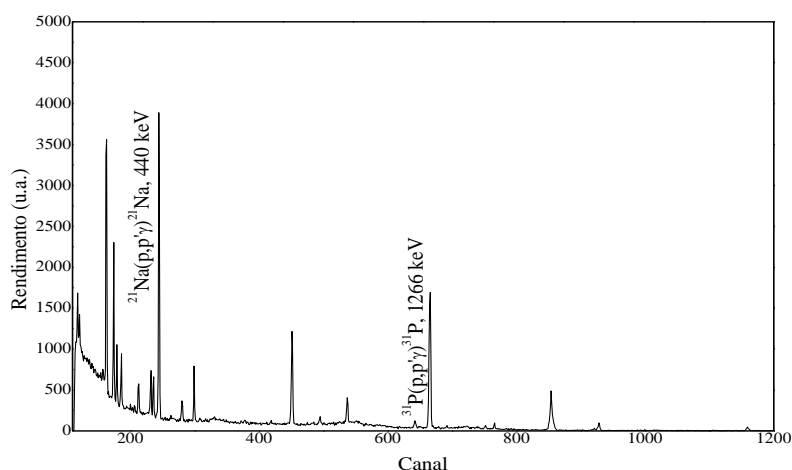


Figura 36) Espectro do rendimento de radiação gama produzida no bombardeamento de um filme fino de  $\text{Ca}_3(\text{PO})_2$  evaporado sobre um filme fino de Ag com prótons com 3.1 MeV de energia.



A carga coletada, em cada análise foi de 20  $\mu\text{C}$ . Os valores da correção do tempo morto são cerca de 8% para as medidas nas ressonâncias mais intensas. Na figura 37 é possível observar um espectro dos prótons dispersos para um feixe de prótons com 3000 keV onde é possível ver o pico da prata claramente separado do fósforo.

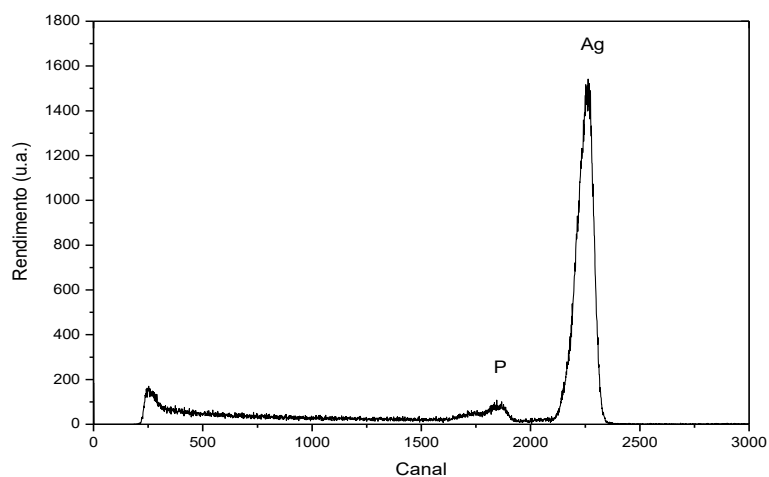


Figura 37) Espectro dos prótons dispersos pelo alvo para  $\theta=155^\circ$ , para um feixe incidente de  $\text{H}^+$  de energia 3.0 MeV.

## Resultados

O rendimento da radiação gama com uma determinada energia  $E$  num ângulo sólido pequeno é determinado através da expressão:

$$Y(E, \theta) = \sigma(E, \theta)N_p N_F \Omega_\gamma \varepsilon_\gamma \Leftrightarrow Y(E, \theta) = \sigma(E, \theta)N_p N_F \varepsilon_{abs} \quad 4.5$$

Onde,  $N_p$  é o número de prótons incidentes,  $N_F$  é o número de núcleos de fósforo por unidade de superfície,  $\Omega_\gamma$  e  $\varepsilon_\gamma$  são o ângulo sólido e a eficiência do detetor, respetivamente e  $\varepsilon_{abs}$  é a eficiência absoluta do detetor que se obtém através da expressão  $\varepsilon_{abs} = \Omega_\gamma \varepsilon_\gamma$ ,  $\sigma(E, \theta)$  é a secção eficaz da reação nuclear para a energia incidente  $E$  e ângulo de deteção  $\theta$ . Fora das ou nas ressonâncias que são largas por comparação com a espessura em energia do alvo, o rendimento da radiação coletada dentro de um ângulo sólido pequeno, é dado por:

$$Y(E, \theta) = \sigma(E, \theta)N_p N_{Ag} r \Omega_\gamma \varepsilon_\gamma \quad 4.6$$

Onde,  $N_{Ag}$  é o número de núcleos de prata por unidade de superfície e  $r$  é o coeficiente estequiométrico que se calcula fazendo a razão entre o número de núcleos de fósforo e de prata determinados a partir do ajuste da figura 35 e no presente caso toma o valor de 0.75.

O número de prótons elasticamente dispersos pela prata segundo um ângulo  $\beta$  pode ser determinado com recurso à expressão:

$$Y_{Ag} = N_p N_{Ag} \sigma_{Ruth}(E, \beta) \Omega_p \varepsilon_p \quad 4.7$$

Onde,  $\Omega_p$  e  $\varepsilon_p$  são o ângulo sólido e a eficiência do detetor de partículas, respetivamente e  $\sigma_{Ruth}(E, \beta)$  é a secção eficaz de Rutherford. Como referido, a eficiência do detetor de partículas é 100 % e o ângulo sólido é  $3.65 \times 10^{-3} \text{ sr}$ . Combinando as expressões 4.6 e 4.7 verifica-se que a secção eficaz é dada por,

$$\sigma(E, \theta) = \left[ \frac{\sigma_{Ruth}(E, \beta) Y(E, \theta) \Omega_p \varepsilon_p}{r Y_{Ag} \Omega_\gamma \varepsilon_\gamma} \right] \quad 4.8$$

A eficiência absoluta é a razão entre o número de fotões detetados e o número de fotões emitidos da fonte. A eficiência absoluta do detetor de radiação gama foi determinada com recurso a fontes radioativas,  $^{133}\text{Ba}$ ,  $^{56}\text{Co}$  e  $^{152}\text{Eu}$  calibradas em atividade com uma incerteza de 5%. A figura 38 mostra a curva de eficiencia do detetor para energias até 3.5 MeV determinada com recurso às fontes mencionadas.

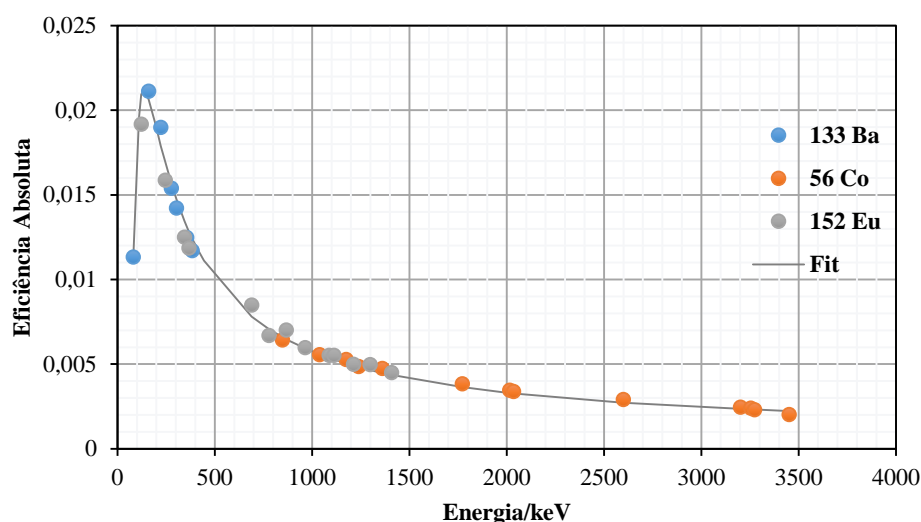


Figura 38) Gráfico da eficiência absoluta do detector em função da energia, obtida com as fontes radioativas  $^{133}\text{Ba}$ ,  $^{56}\text{Co}$  e  $^{152}\text{Eu}$ .

A obtenção de espectros de partículas permite também uma monitorização adicional da energia do acelerador. O rendimento de prótons dispersos por prata segue uma dependência com o inverso do quadrado da energia dos prótons, prevista para a seção eficaz de Rutherford. A figura 39 apresenta para este exercício os resultados obtidos demonstrando a referida dependência.

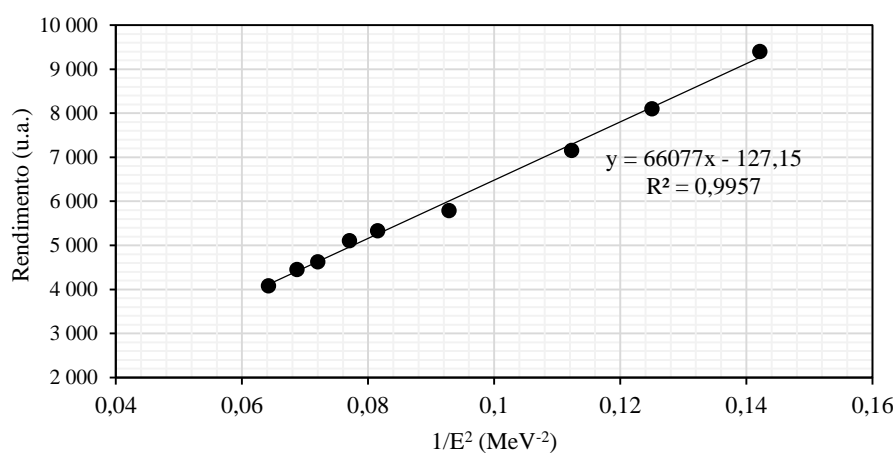


Figura 39) Gráfico que mostra a dependência do rendimento de partículas com o inverso do quadrado da energia.

Após efetuados os cálculos para cada energia do feixe incidente, obteve-se a secção eficaz em função da energia para  $\theta_{\text{Lab}} = 130^\circ$ , que se encontra representada na figura 40.

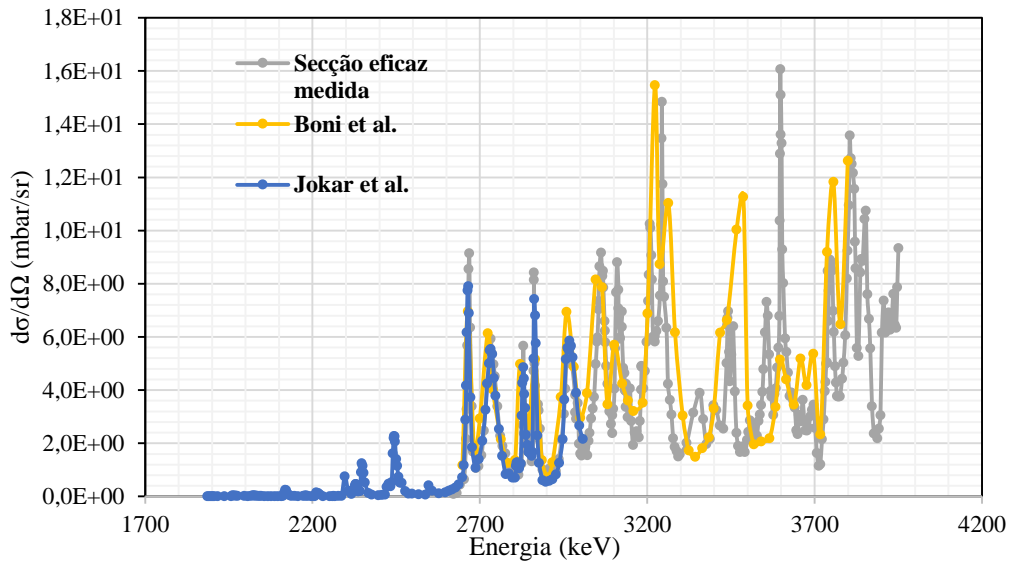


Figura 40) Função de excitação da reação de dispersão inelástica  $^{31}\text{P}(p,p'\gamma)^{31}\text{P}$  para o canal de saída  $\gamma=1266$  keV determinada experimental para  $\theta_{\text{Lab}} = 130^\circ$ . Encontram-se também representadas as funções de excitação publicadas por Boni et al. e Jokar et al.

Como é possível verificar, pela análise do gráfico da figura 40, os valores da seção eficaz medida em diferentes laboratórios são concordantes na gama de energias em que se interseitam (até aproximadamente 3 MeV). No entanto, quando se compara com a seção eficaz de *Boni et al.*, sobretudo para energias mais elevadas surgem algumas discrepâncias que se podem dever ao fato de a seção eficaz ter sido medida em intervalos mais pequenos de energia do feixe incidente e, por outro lado, o ângulo de deteção também ser diferente.

Os resultados para a seção eficaz inelástica total para o canal de saída  $\gamma=1266$  keV, determinados pelo método descrito  $\sigma^{\text{exp}}(E_0)$  são apresentados na tabela que se encontra no Anexo 1. Como a radiação medida tem origem num estado excitado com momento angular total igual a  $3/2$ , a distribuição angular da radiação pode não ser isotrópica devido ao alinhamento desse estado. No entanto como o detetor gama está posicionado a  $130^\circ$  relativamente à direção do feixe e atendendo a que a distribuição angular varia com  $\cos^2\theta$  pode-se obter a seção eficaz total sem correções de anisotropia. Os resultados da tabela do anexo 1 estão afetados de uma incerteza que resulta da combinação das incertezas da razão estequiométrica (5%), da eficiência absoluta do detetor, de outras contribuições do produto  $N_p N_{Ag}$  (3%) e do rendimento gama (3%).

Foram medidos os rendimentos gama numa pastilha de fosfato de cálcio puro, com composição conhecida. A partir dos resultados experimentais foi feito o cálculo da fração atômica com recurso ao programa *ERYA* [141], utilizando a seção eficaz determinada e apresentada

anteriormente. Atendendo à composição estequiométrica do fosfato de cálcio, a pastilha contém 15% (fração atômica) de fósforo. Os resultados obtidos mostram uma boa concordância entre o valor experimental e o valor teórico.

<b>Pastilha de fosfato de cálcio <math>\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2</math> 15% P (Fração Atômica)</b>		
<b>HV (kV)</b>	<b>Energia (keV)</b>	<b>Fração Atômica (%)</b>
1904.6	3803.9	14.6
1946.5	3887.3	14.6
1858.6	3712.3	14.7
1822.3	3640.1	14.8
1789.5	3574.8	14.8
1742.0	3480.3	14.8
1681.6	3360.1	15.2
1651.5	3300.2	15.1
1577.0	3151.9	15.2
1548.5	3095.2	15.1
1504.2	3007.1	15.0
1460.5	2920.1	14.9
1400.5	2800.7	14.9

Tabela 3) Resultados da fração atômica de fósforo aferida a partir do rendimento gama da análise de uma pastilha de fosfato de cálcio para várias energias.

Note-se que, para o rendimento gama, a contribuição do valor absoluto da carga é constante e o mesmo se passa com a eficiência do detetor; o poder de paragem varia lentamente com a energia. Assim, este teste feito para vários valores de energia valida a forma como a seção eficaz depende da energia. Quanto ao valor absoluto fica validado dentro do intervalo de incerteza dos valores de rendimento que são cerca de 9%.



# **Otimização de Procedimentos para Análise das Amostras de Osso**

---

## Introdução

---

Atualmente a avaliação da saúde óssea é feita sobretudo com recurso a medidas da densidade mineral óssea por DEXA (*Dual Energy X-ray Absorptiometry*). Este método é caracterizado por uma boa reprodutibilidade, precisão, segurança e facilidade de execução sendo por isso o mais aplicado no diagnóstico da osteoporose, na avaliação do risco de fratura e na monitorização do efeito de terapias anti-osteoporóticas. No entanto, esta técnica avalia apenas a quantidade de osso, não dando informações sobre a sua qualidade ou estrutura.

A incorporação de átomos e moléculas na estrutura da hidroxiapatite pode modificar a estrutura mineral e o grau de mineralização do osso e pode ser um fator determinante na avaliação da qualidade do osso. Além disso, a deficiência e/ou excesso de certos elementos no osso podem dar informações bastante úteis para prevenção e diagnóstico precoce de patologias ósseas. A razão Ca/P tem inclusivamente sido sugerida como um possível biomarcador da saúde óssea [4, 123] e a sua análise *in vivo* poderá dar um contributo fundamental para o diagnóstico precoce das patologias ósseas. Compreende-se assim a importância do desenvolvimento de metodologias que permitam aceder à constituição e qualidade da componente mineral do osso e da sua microestrutura. Este é o tipo de informação que não é possível obter por DEXA, mas que facilmente se obtém com as técnicas de análise por feixe de iões ou por espectroscopia de fluorescência de raios-X.

O que se pretende neste trabalho é a análise da estrutura mineral do osso para quantificação de elementos maioritários e traço sem destruição da estrutura do osso. No entanto, a análise de amostras ósseas está dependente de diversos fatores nomeadamente, da idade do paciente, do género, do tipo de osso, da medicação, entre outros fatores, o que faz com que este tipo de análises possa ser uma tarefa bastante complicada. No sentido de reduzir uma das fontes de variabilidade, optou-se por reduzir a análise a apenas um osso, a cabeça do fémur. No entanto, uma das análises preliminares incidiu sobre osso da anca de uma paciente com osteoporose. Este osso foi analisado na microsonda nuclear por  $\mu$ -PIXE e por  $\mu$ -EBS (*Elastic Backscattering Spectrometry*) e os resultados são especialmente interessantes dado que foi possível ver numa mesma amostra dois tipos de osso, osso cortical e osso trabecular. Como algumas amostras de osso apresentavam um aspeto gorduroso, devido à presença de medula, o que poderia interferir com as medidas em vazio, optou-se por testar dois procedimentos de preparação de amostras, num dos quais foi aplicada uma combinação de solventes, para



remoção da gordura e, no outro, água destilada. Neste capítulo são apresentados os resultados destas análises com indicação acerca do procedimento de preparação de amostra escolhido para tratamento do conjunto final de amostras ósseas.

# Análise de uma amostra de osso da anca

---

As anormalidades morfológicas que caracterizam a osteoporose podem induzir modificações nas concentrações dos elementos e/ou na distribuição dos elementos majoritários e dos elementos traço nos ossos. Para além disso como já foi referido, uma concentração deficiente ou em excesso de um elemento específico pode despoletar alterações metabólicas que podem culminar em patologias ósseas. Neste capítulo são apresentados os resultados da análise de uma amostra de osso da anca de uma paciente com osteoporose por  $\mu$ -PIXE e por  $\mu$ -EBS para identificar e determinar as concentrações elementares no osso osteoporótico e para fazer um mapeamento 2D dos elementos em regiões específicas da amostra [163]. Os espectros de EBS (*Elastic Backscattering Spectrometry*) permitem quantificar o oxigénio e o carbono nas amostras de osso, o que não é possível com a técnica de PIXE. A técnica de EBS diferencia-se da técnica de RBS pela presença de ressonâncias decorrentes das dispersões elásticas com os núcleos leves da amostra. Deve salientar-se que o tipo de corte efetuado no procedimento de preparação da amostra possibilitou a análise de osso cortical e de osso trabecular tendo sido possível ver as diferenças nas distribuições dos elementos majoritários em ambos os tipos de osso. Este estudo é interessante dado que o tecido trabecular é mais afetado do que o tecido cortical na osteoporose.

## 1. Preparação da Amostra

A amostra de osso foi removida durante uma cirurgia à anca, de um paciente do sexo feminino, com 86 anos. Foi efetuado um corte na peça óssea com uma lâmina de SiC que usa água para arrefecimento, tendo-se assim obtido uma amostra com aproximadamente 3 mm de espessura. Esta amostra foi subsequentemente aquecida em água por alguns minutos e depois polida usando um pano de carboneto de silício com um fluxo contínuo de água tendo-se obtido uma amostra com 2 mm de espessura (figura 41).



Figura 41) Imagem da amostra de osso osteoporótico analisada, onde é possível ver os dois tipos de tecido ósseo, cortical e esponjoso.

## 2. Condições Experimentais

A amostra óssea foi analisada na microsonda nuclear no LATR-CTN/IST (*Oxford Microbeams Ltd*, UK). A análise foi feita em condições de vácuo e foi aplicado um feixe focado de prótons ( $4 \times 5 \mu\text{m}^2$ ) com 2 MeV de energia, produzido pelo acelerador Van de Graff de 2.5 MV [164]. O hardware e software OMDAQ foi usado para coletar e processar os dados da microsonda nuclear em modo *listmode* (ou evento-por-evento) de coleção de dados. Os mapeamentos elementares 2D têm  $256 \times 256$  pixels. A câmara experimental contém um detetor de raios-X da Link com  $80 \text{ mm}^2$  de área ativa, 145 eV de resolução em energia, posicionado  $135^\circ$  relativamente à direção do feixe, e um detetor de partículas PIPS colocado  $140^\circ$  relativamente à direção do feixe, o que permitiu registrar simultaneamente a radiação-X e os prótons retrodispersos pela amostra, respetivamente. Durante as análises foi aplicado um filtro de mylar com  $50 \mu\text{m}$  de espessura no detetor de Si(Li) para prevenir que os prótons retrodispersos entrem no detetor. No entanto verificou-se que a intensidade das linhas K do Ca no espectro eram muito intensas e, consequentemente, os limites de deteção para os elementos de elevado Z eram pobres para uma carga coletada razoável. No sentido de melhorar os limites de deteção dos elementos mais pesados, algumas análises foram feitas colocando um filtro de perspex com 1 mm de espessura à frente do detetor. O ajuste dos espectros de raios-X e a quantificação foram feitas com recurso ao GUPIX [165] e a análise dos espectros de partículas retrodispersas foi feita com recurso ao WiNDF [166].

### 3. Resultados

Foi feito um varrimento de uma área seleccionada da amostra com o feixe de protões ( $2640 \times 2640 \mu\text{m}^2$ ) e foram obtidas as imagens das distribuições elementares para o Ca, P e Fe (figura 42).

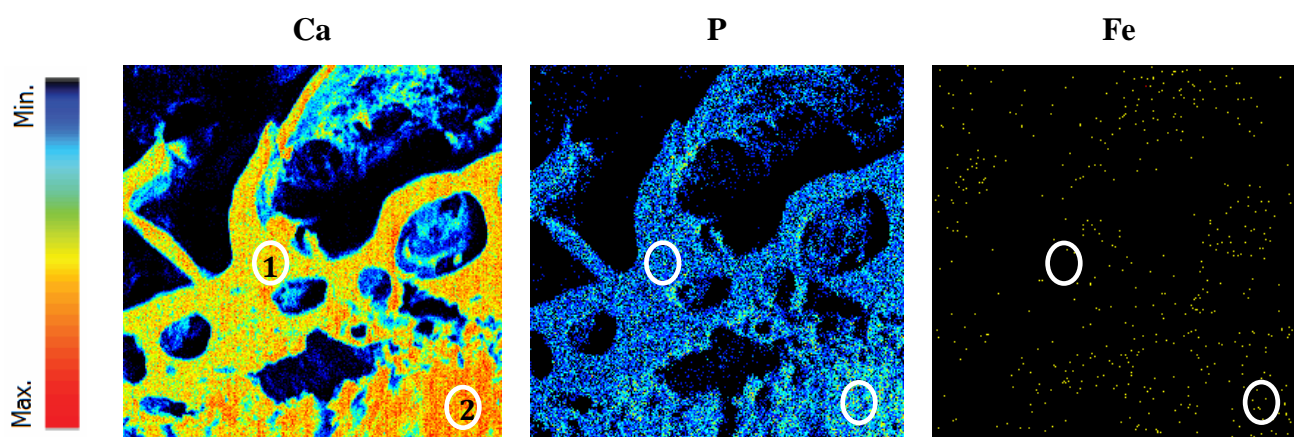


Figura 42) Distribuição elemental 2D do Ca, P e Fe ao longo da secção do osso ( $2640 \times 2640 \mu\text{m}^2$ ).

O feixe foi posicionado numa região próxima do bordo do osso o que permitiu a análise simultânea de dois tipos diferentes de tecido ósseo, o tecido trabecular (1) e o tecido cortical (2). As áreas seleccionadas para uma análise quantitativa estão identificadas com os círculos brancos na figura 42 e os resultados são apresentados na tabela 4. Os mapas mostram que a distribuição dos elementos maioritários não é homogénea quando se consideram os dois tipos de tecidos, verificando-se que a concentração de cálcio e de fósforo é maior no osso cortical. Este é um dos motivos pelos quais o osso trabecular é mais suscetível de fratura osteoporótica. As figuras 43 e 44 constituem os espetros PIXE obtidos para estas duas regiões, osso trabecular e cortical, respetivamente. Para além do cálcio e do fósforo foi possível identificar e quantificar outros elementos como o cloro, o enxofre, o zinco e, no osso cortical, para além destes, o ferro. As concentrações destes elementos são apresentadas na tabela 4.

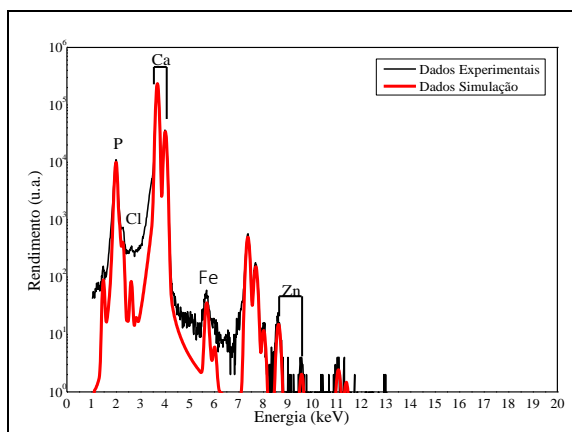


Figura 43) Espectro de  $\mu$ -PIXE obtido para o tecido trabecular (região 1).

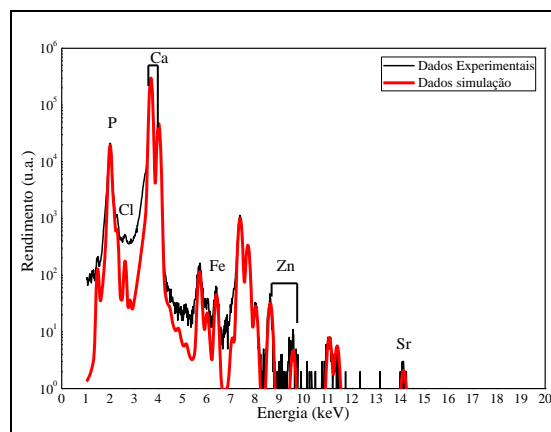


Figura 44) Espectro de  $\mu$ -PIXE obtido para o tecido cortical (região 2).

Para melhorar o limite de detecção dos elementos mais pesados no tecido cortical, foi colocado um filtro de perspex e foi aumentada a corrente do feixe. Assim foi possível identificar outros elementos mais pesados no espectro de raios-X (figura 45), o ferro, o cobre, o zinco, o bromo e o estrôncio cujas concentrações também se encontram na tabela 4.

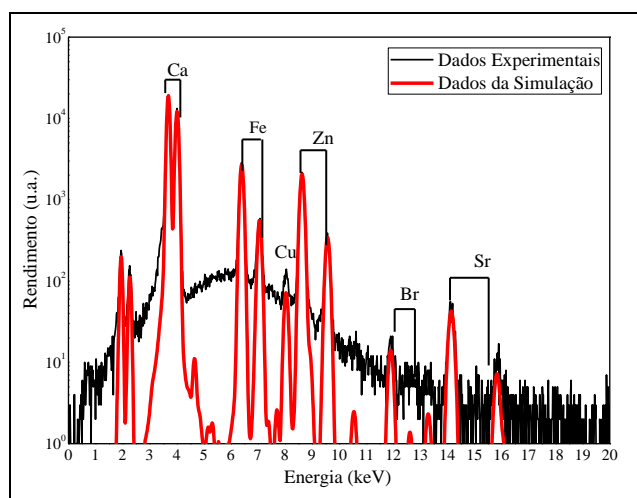


Figura 45) Espectro de  $\mu$ -PIXE obtido para o tecido cortical usando um filtro de perspex com 1 mm de espessura (região 2).

A análise dos espectros de  $\mu$ -EBS permitiu obter informação acerca das concentrações de oxigênio e de carbono. O ajuste dos espectros foi feito com recurso ao WinDF assumindo que a composição da amostra era essencialmente hidroxiapatite. As figuras 46 e 47 mostram os espectros de  $\mu$ -EBS e respetivo ajuste para o tecido trabecular e cortical, respetivamente. Para o ajuste do espectro foram consideradas duas camadas, uma primeira de menor espessura de  $\sim 8 \times 10^3$  ( $\times 10^{15}$  átomos/cm<sup>2</sup>). A composição das camadas baseou-se nos resultados de PIXE para

as concentrações de cálcio e fósforo. Na primeira camada introduziu-se também carbono na estimativa da matriz.

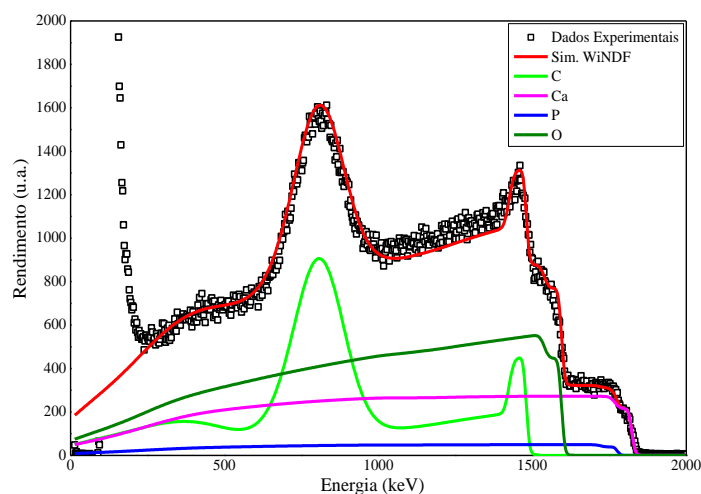


Figura 46) Espectro de  $\mu$ -EBS para o osso trabecular.

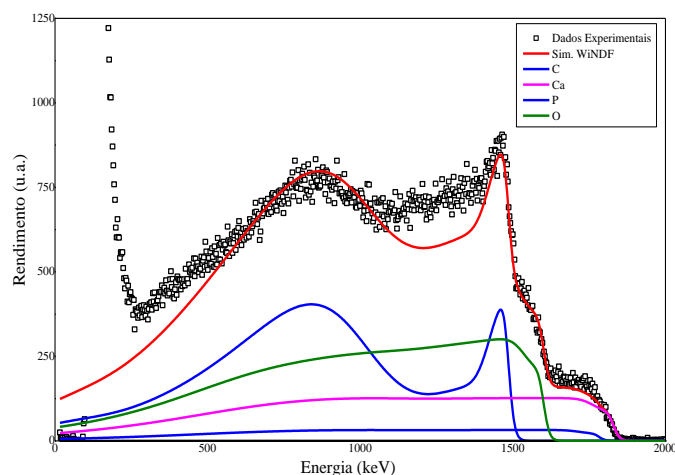


Figura 47) Espectro de  $\mu$ -EBS para o osso cortical.

As razões Ca/P registadas para o osso trabecular e cortical foram 4.2 e 2.7, respetivamente. Estes valores são mais elevados do que o valor de referência para o osso saudável, calculado a partir da estequiometria da hidroxiapatite,  $\approx 2.2$ , e do que os valores encontrados na literatura para ossos saudáveis [4, 167]. Os resultados parecem, portanto, indicar que existe uma diferença entre os valores da razão Ca/P para o osso osteoporótico por comparação com o osso saudável. Para o osso trabecular obteve-se uma razão Ca/P que é cerca de 2 vezes superior à do osso saudável e este valor está de acordo com resultados recentemente publicados para ossos com patologia,  $\approx 5.21$  [15]. Na osteoporose, o osso trabecular é mais afetado do que o osso cortical com maior perda de osso havendo evidências de que os grupos fosfato são substituídos por grupos carbonato e, estes dados permitem de certa forma explicar

as diferenças registadas para o osso cortical e trabecular. O paciente não estava a tomar qualquer tipo de medicação para tratar a osteoporose ou outras doenças ósseas, apenas algumas vitaminas e suplementos minerais que contêm entre outros, vitamina D, Ca e P. Dado que a vitamina D atua através de um recetor nuclear para desempenhar funções vitais no metabolismo ósseo, como absorção de cálcio e de fosfato no intestino, mobilização de cálcio no osso e reabsorção de cálcio nos rins, o uso deste tipo de suplementos pode promover uma maior retenção de Ca, o que também pode justificar os valores elevados da razão Ca/P.

		Espectro de PIXE		
		1	2	3
		Tecido Trabecular	Tecido Cortical	Tecido Cortical (Filtro de Perspex)
Concentração (% m/m)	Ca	16.9±0.4	33.6±0.3	-
	P	4.0±1.0	12.5±0.7	-
Concentração (μg/g)	S	269±63	873±122	-
	Zn	77±14	262±28	250±3
	Cl	95±22	321±40	-
	Fe	-	148±16	271±3
	Br	n.d.	-	5±1
	Sr	n.d.	-	36±3
	Cu	n.d.	-	8±1

Tabela 4) Concentração dos elementos identificados no espectro de μ-PIXE para o tecido trabecular (1) e diferentes partes do tecido cortical (2 e 3). Não foi possível determinar as concentrações de bromo, estrôncio e cobre para o osso trabecular (n.d.). As incertezas apresentadas são calculadas com base nos valores da incerteza do ajuste e da incerteza experimental que são fornecidas no ficheiro de output do GUPIX.

A concentração de ferro no tecido cortical é bastante diferente nas análises 2 e 3. Dado que os resultados quantitativos foram obtidos em duas regiões diferentes, estes resultados podem refletir a variabilidade intrínseca do conteúdo de ferro no tecido ósseo, possivelmente devido ao facto de a componente orgânica não ter sido totalmente eliminada. De fato, para a análise na região 2 a concentração de ferro está dentro da gama de valores encontrada na literatura, 135±88 [4]. O bromo é um elemento traço não essencial e a sua presença pode dever-se à utilização de

medicação para dormir. As diferenças registadas para o zinco para os dois tipos de osso estão de acordo com resultados recentes que mostram que as concentrações deste elemento são inferiores no tecido trabecular por comparação com o tecido cortical [3]. De referir também que baixas concentrações de zinco estão relacionadas com o aparecimento da osteoporose e, o osso trabecular é o osso mais afetado por esta patologia, como já foi referido. Para o osso trabecular, os resultados estão de acordo com os da referência [3], que são aproximadamente  $88 \pm 24$  ppm e com outros valores publicados na literatura [9].



# Métodos de Preparação de Amostras

---

A preparação de amostras de osso revelou que estas podem conter gordura devido à presença de medula o que pode interferir nas medidas experimentais, dado que são realizadas em vácuo. Para além disso, a gordura faz com que as amostras sejam mais isolantes, pelo que quando irradiadas com o feixe de partículas não conduzem bem a carga sendo esta escoada sob a forma de descargas. Como tal, foram preparadas duas amostras de osso osteoporótico, de pacientes na mesma faixa etária e idades aproximadas, seguindo procedimentos diferentes. Estas amostras foram analisadas por  $\mu$ -PIXE e  $\mu$ -EBS, na microsonda nuclear no LATR-CTN/IST, e por  $\mu$ -XRF no espectrómetro comercial M4-Tornado da Bruker na FCT/UNL.

## 1. Preparação das Amostras

Duas cabeças de fémur de pacientes com 78 e 81 anos foram preparadas por dois procedimentos diferentes. Foi feita uma perfuração cilíndrica em ambas as amostras, como exemplificado na figura 48. Os cilindros de osso foram posteriormente cortados em 8-10 secções com aproximadamente 2 mm de espessura e 1 cm de diâmetro. As secções de um dos ossos foram lavadas com água destilada (figura 49a) e as secções do outro osso foram lavadas com etanol e clorofórmio, um processo conhecido como *deffating* (figura 49b). As secções de osso foram colocadas no liofilizador por 24 h e foram catalogadas por forma a que à primeira secção do cilindro correspondesse o número 1, à seguinte o número 2, e assim sucessivamente. Para este exercício são apresentados apenas os resultados para a secção número 3 de ambos os ossos, que é uma amostra de tecido trabecular (figura 49).

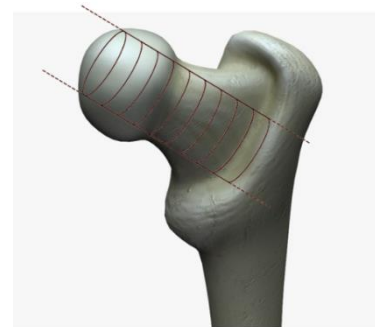


Figura 48) Esquematização do corte efetuado nas amostras de cabeça do fémur.

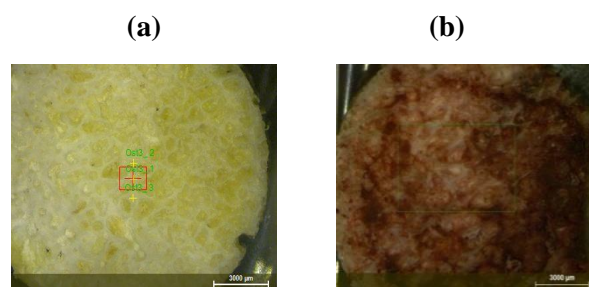


Figura 49) Imagem da secção número 3, (a) lavada com água destilada e (b) lavada com etanol e clorofórmio.

## 2. Condições Experimentais

As amostras foram analisadas na microsonda nuclear, em condições de vácuo, usando um feixe de prótons focado ( $4 \times 5 \mu\text{m}^2$ ) com 2.0 MeV, produzido pelo acelerador Van de Graaff do LATR-CTN/IST. O detector de raios-X utilizado foi um detector SDD da Bruker com  $30 \text{ mm}^2$  de área ativa, posicionado  $135^\circ$  relativamente à direção do feixe. O detector de partículas é um detector PIPS posicionado  $140^\circ$  relativamente à direção do feixe. Foi colocado um filtro de mylar de  $50 \mu\text{m}$  de espessura à frente do detector de raios-X. O software OMDAQ foi usado para coletar e processar os dados da microsonda nuclear em modo *listmode* (ou evento-por-evento) de coleção de dados. O ajuste dos espectros de raios-X e a quantificação foi feita com recurso ao GUPIXWIN [165] e a análise dos espectros de partículas foi feita com recurso ao WINDF [166]. Os mapas elementares 2D têm  $256 \times 256$  pixels.

As análises de  $\mu$ -XRF foram realizadas no espectrómetro comercial M4-Tornado da Bruker na FCT/UNL. A excitação de fluorescência é realizada com um tubo de radiação com um ânodo de Rh. A ótica de policapilares permite uma focagem do feixe até  $25 \mu\text{m}$  de diâmetro (para a risca K do Mo). A detecção dos raios-X é feita com recurso a um detector SDD dispersivo em energia com área ativa de  $30 \text{ mm}^2$ . As análises são realizadas em vácuo,  $\approx 20 \text{ mbar}$ . As análises foram feitas em diferentes condições de operação do tubo: 50 kV, 100  $\mu\text{A}$  sem filtro e 50 kV, 600  $\mu\text{A}$  com um filtro de Al/Ti/Cu - 100/50/25  $\mu\text{m}$ . Optou-se por fazer a análise das amostras com filtro para melhorar os limites de detecção dos elementos mais pesados. A análise dos espectros foi feita com o WINAXIL<sup>®</sup> software package [146] e a quantificação foi feita por *compare mode*, usando uma reta de calibração determinada através de materiais de referência padrão como será explicado em detalhe no próximo capítulo.

### 3. Resultados

Tal como referido, cada amostra de osso é cortado em aproximadamente 10 secções que são numeradas de 1 a 10. A secção número 1 é cartilagem, enquanto que a partir da secção número 2, todas as secções são de tecido trabecular. Como neste caso, o objetivo é verificar se existem diferenças na análise quando são utilizados diferentes solventes na preparação das amostras, serão apresentados os resultados de ambas as técnicas apenas para a secção número 3, de ambos os ossos.

O varrimento de uma área selecionada de osso trabecular com o feixe de prótons permitiu a obtenção das distribuições do cálcio e do fósforo para cada amostra (figura 50).

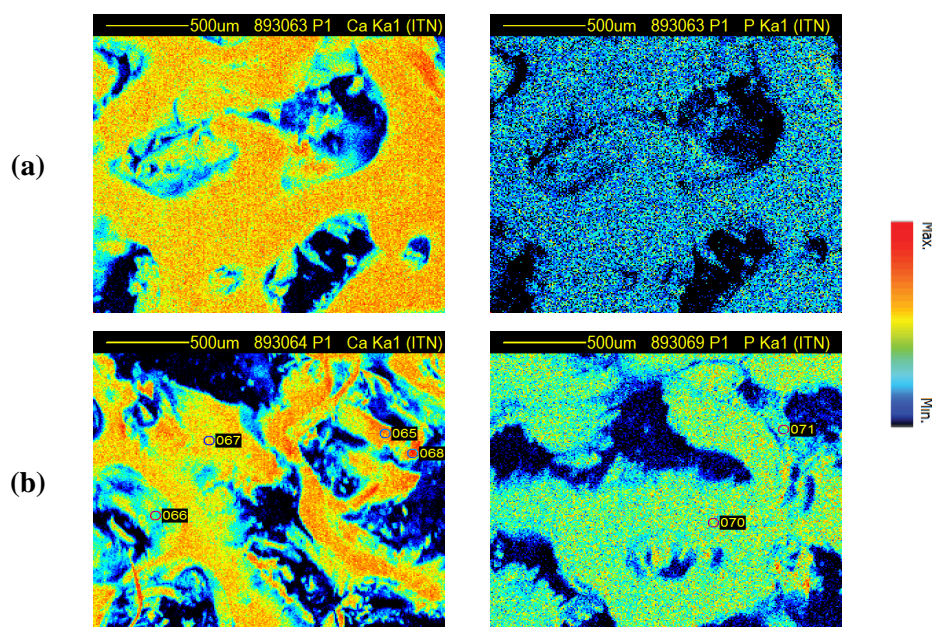


Figura 50) Distribuição elemental 2D de  $\mu$ -PIXE ( $2120 \times 2120 \mu\text{m}^2$ ) do Ca (esquerda) e do P (direita) para a (a) amostra lavada com água destilada e a (b) amostra lavada com etanol e clorofórmio.

De seguida são apresentados os espectros de raios-X e de partículas retrodispersas para cada amostra da figura 49. A análise dos espectros de  $\mu$ -EBS permitiu obter informação acerca das concentrações de oxigénio e de carbono. Nas figuras 51 e 52 são representados os espectros de  $\mu$ -EBS para ambas as amostras. Para o ajuste do espectro foram consideradas duas camadas, uma primeira de menor espessura de  $\sim 2 \times 10^3$  ( $\times 10^{15}$  átomos/ $\text{cm}^2$ ). A segunda camada foi definida como sendo essencialmente hidroxiapatite, no entanto, a estequiometria introduzida baseou-se nos resultados de  $\mu$ -PIXE para as concentrações de cálcio e fósforo. Na primeira

camada introduziu-se também carbono na definição da matriz. A análise dos espectros de  $\mu$ -EBS permite concluir que o osso lavado com etanol e clorofórmio apresenta mais carbono e oxigênio por comparação com o osso lavado com água destilada. Estes resultados podem dever-se aos solventes utilizados na preparação do osso.

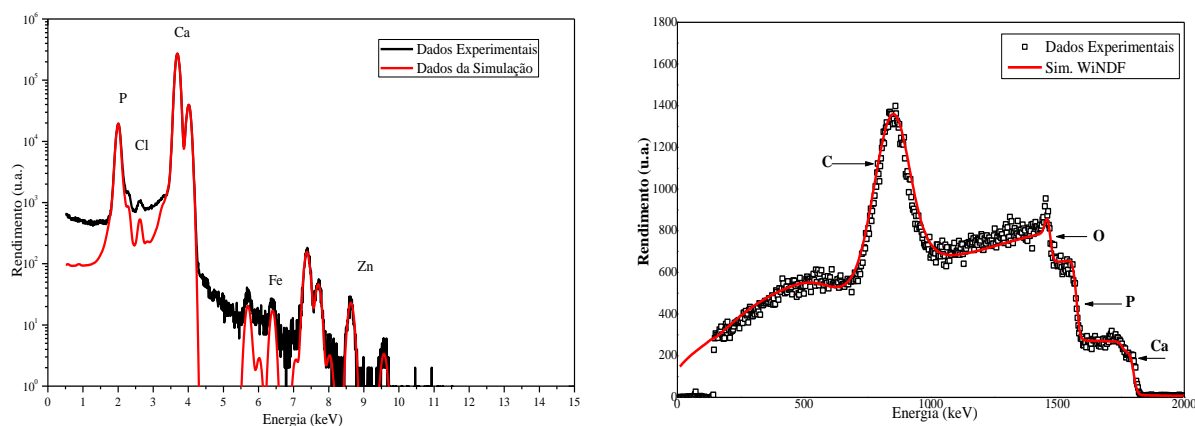


Figura 51) Espectro de raios-X (esquerda) e espectro de  $\mu$ -EBS (direita) da amostra lavada com água destilada.

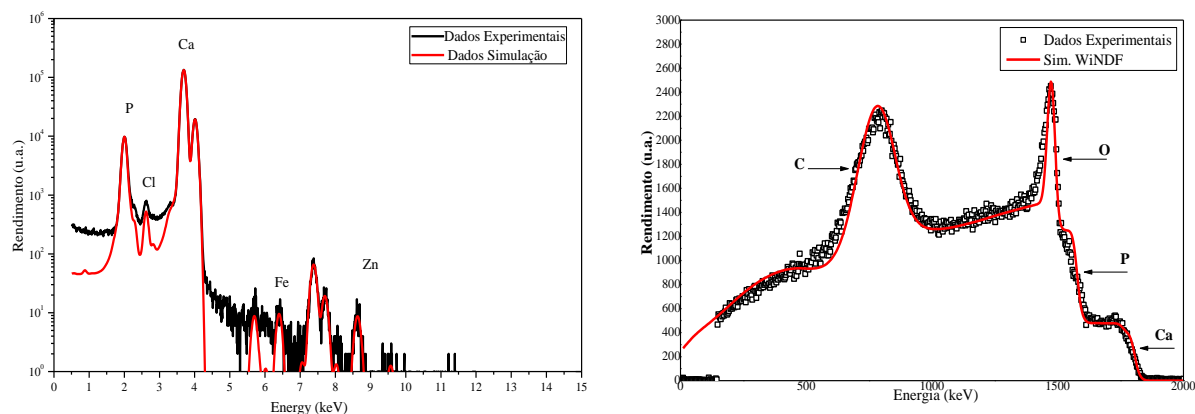


Figura 52) Espectro de raios-X (esquerda) e espectro de  $\mu$ -EBS (direita) da amostra lavada com etanol + clorofórmio.

As concentrações dos elementos maioritários e de alguns elementos traço, Fe e Zn, foram obtidas a partir dos ajustes dos espectros de  $\mu$ -PIXE. A análise foi feita em três áreas diferentes da amostra. Na tabela 5 são apresentados o valor médio e respectiva incerteza. A incerteza calculada tem em conta o desvio padrão e a incerteza associada a cada análise, que é calculada

com base nos valores da incerteza do ajuste e da incerteza experimental que são fornecidos no ficheiro de output do GUPIXFIT.

		Amostra lavada com água destilada			Amostra lavada com etanol + Clorofórmio		
		Secção 3					
Concentração (% m/m)	P	8.0	±	2.2	12.5	±	5.8
	Ca	20.3	±	4.7	23.4	±	7.9
	S	0.11	±	0.03	0.16	±	0.07
	Cl	0.06	±	0.02	-	-	-
Concentração (µg/g)	Zn	109	±	33	172	±	57
Razão Ca/P		2.5 ± 1.0			2.5 ± 0.4		

Tabela 5) Resultados da análise por  $\mu$ -PIXE na microsonda nuclear para a amostra lavada com água destilada e para a amostra lavada com etanol e clorofórmio. A razão Ca/P é calculada para cada área analisada. O resultado apresentado corresponde ao valor médio dos valores obtidos e a incerteza é obtida através da dispersão dos resultados experimentais.

Os resultados de  $\mu$ -XRF encontram-se resumidos na tabela 6. A análise foi feita igualmente em três áreas diferentes da amostra. Na tabela são apresentados a concentração para cada elemento, que é a média ponderada dos valores obtidos, e a respetiva incerteza, calculada com base no desvio padrão e na incerteza associada a cada análise.

		Amostra Lavada com Água Destilada			Amostra lavada com etanol + clorofórmio		
		Secção 3					
Elementos Maioritários (% m/m)	P	9.3	±	1.2	16.0	±	8.0
	Ca	22.0	±	2.0	23.0	±	5.0
Concentração (µg/g)	Zn	178	±	22	197	±	45
	Sr	62	±	6	240	±	33
	Pb	17.1	±	3.2	18.5	±	8.2
Razão Ca/P		2.5 ± 0.2			3.7 ± 2.1		

Tabela 6) Resultados da análise por  $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker para a amostra lavada com água destilada e para a amostra lavada com etanol e clorofórmio. A razão Ca/P é calculada para cada área analisada. O resultado apresentado corresponde ao valor médio dos valores obtidos e a incerteza é obtida através da dispersão dos resultados experimentais.

Foram analisadas também as amostras 1, 2 e 9 de ambos os ossos por  $\mu$ -XRF e os resultados são apresentados na tabela 7.

	Amostra Lavada com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					Amostra lavada com etanol + Clorofórmio				
	Concentração (%m/m)		Concentração (µg/g)			Concentração (%m/m)		Concentração (µg/g)		
Secção	Ca	P	Zn	Sr	Ca/P	Ca	P	Zn	Sr	Ca/P
1	25±4	11±2	171±18	58±9	2.7±0.2	18±4	13±3	177±31	133±32	1.4±0.4
2	19±3	9±2	135±15	40±5	2.0±0.1	20±13	8±4	227±79	133±31	2.4±1.3
3	22±2	9±1	182±26	49±5	2.5±0.2	23±5	16±8	197±45	240±33	3.7±2.1
9	23±2	10±1	160±40	62±28	2.5±0.1	30±5	26±5	230±33	100±31	1.1±0.3

Tabela 7) Resultados da análise por  $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker das amostras 1, 2, 3 e 9 de ambos os ossos. A razão Ca/P é calculada para cada área analisada. O resultado apresentado corresponde ao valor médio dos valores obtidos e a incerteza é obtida através da dispersão dos resultados.

Verifica-se uma maior variabilidade na concentração de todos os elementos para as amostras lavadas com etanol e clorofórmio entre áreas analisadas (nomeadamente para  $\mu$ -XRF). Esta variabilidade dos valores de concentração entre áreas analisadas faz com que o erro associado ao valor médio das análises seja muito elevado. Posto isto, embora ambos os solventes sejam referenciados na literatura para preparação de amostras de osso [21], optou-se pela água destilada na preparação do conjunto final de amostras.

Os resultados das tabelas 5 e 6 permitem verificar que os resultados obtidos por ambas as técnicas e para os dois procedimentos de preparação são muito semelhantes, para todos os elementos e para a razão Ca/P. Os resultados obtidos para todas as amostras de cada osso analisado por  $\mu$ -XRF (tabela 7) também são concordantes dentro da incerteza, para cada elemento e para a razão Ca/P, com exceção do estrôncio.

De referir também que foi detetado chumbo nestas amostras. As amostras analisadas são de pacientes residentes em Lisboa, e só em meados da década de 90 é que surgiram os combustíveis sem chumbo e, atendendo a que o tempo de meia-vida do chumbo no organismo é de ~27 anos e, dada a grande afinidade deste elemento para o osso, estes resultados parecem refletir a exposição ambiental.

Para obter informação adicional, todas as amostras de osso lavadas com água destilada foram também analisadas num equipamento de EDXRF com geometria triaxial do Centro de Física Nuclear da Universidade de Lisboa. Neste caso o feixe de raios-X tem dimensões que correspondem a obter uma média dos resultados tirados ponto a ponto no  $\mu$ -XRF. Os resultados encontram-se na tabela 8. Observa-se uma depleção dos elementos maioritários e também do zinco e do estrôncio na primeira amostra, que é cartilagem, por comparação com as restantes

amostras de osso trabecular. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por PIXE e PIGE (capítulo 6). A análise dos resultados do  $\mu$ -XRF não permitem que sejam tiradas as mesmas conclusões. Dado que o algoritmo de quantificação é direcionado para amostras leves cuja composição é maioritariamente (> 90 %) oxigénio, carbono e hidrogénio, as incertezas associadas aos valores de concentração são bastante significativas. No entanto, a comparação dos resultados entre amostras é viável e permite distinguir claramente, tal como referido, entre tecido da cartilagem e tecido trabecular.

Secção	Concentração (%m/m)		Concentração ( $\mu$ g/g)				
	Ca	P	K	Fe	Zn	Sr	Pb
1	4.9	2.2	204.0	206.5	56.0	18.7	2.7
2	25.6	11.6	133.1	96.0	168.2	52.6	7.1
3	24.4	10.7	142.0	55.0	147.0	57.0	10.0
4	24.2	10.4	134.9	150.8	153.4	40.1	7.7
5	27.9	11.8	138.3	72.5	181.2	52.2	9.0
6	23.0	10.2	147.0	42.4	139.3	50.2	10.5
7	25.7	11.8	137.4	60.8	170.3	49.1	8.6
8	23.9	10.0	132.9	44.9	138.2	49.7	9.8
9	23.4	10.2	138.8	45.1	145.2	48.1	10.8

Tabela 8) Resultados da análise num equipamento EDXRF triaxial das amostras de osso lavadas com água destilada. O processo de análise e quantificação faz com que a incerteza associada a cada uma destas amostras seja superior ao obtido por  $\mu$ -XRF.

Dados os resultados obtidos, como referido anteriormente, optou-se por usar a água destilada como solvente para remoção da componente orgânica do conjunto final de amostras. Como foi considerado pertinente estudar a concentração nos elementos ao longo da cabeça do fémur, o tipo de corte escolhido é o que se encontra exemplificado na figura 48.





# **Distribuição Elementar no Osso com Patologia**

---

## Introdução

---

As doenças ósseas, nomeadamente a osteoporose e a doença óssea de Paget, comprometem gravemente a qualidade de vida do paciente. A osteoporose já foi descrita anteriormente, e é caracterizada por uma perda de osso que afeta sobretudo o tecido trabecular. O estudo das concentrações e distribuições dos elementos no osso pode dar informação acerca da perda de substâncias inorgânicas no osso, podendo dar um importante contributo para o desenvolvimento de uma base científica para prevenção e terapia da osteoporose e outras patologias ósseas. Os dados existentes sobre a epidemiologia da doença óssea de Paget levantam a suspeita de que esta patologia óssea pode estar associada a uma exposição ambiental, e nesse sentido as técnicas escolhidas para análise das amostras podem dar um bom contributo. Existem na literatura resultados da aplicação de várias técnicas como, análise por ativação neutrónica, PIXE e fluorescência de raios-X (principalmente SR-XRF), para análise de osso osteoporótico [8, 11, 96] e osteoartrite [12, 15, 167], para tecido cortical e para tecido trabecular [6, 99]. Também para o osso saudável é possível encontrar vários resultados na literatura [4, 123]. Para o osso com DOP só recentemente foi publicado um estudo da análise de ossos afetados com a patologia com recurso a fluorescência de raios-X [90]. As análises foram feitas em ossos de fémur e de crânio que estavam depositadas no banco de ossos.

Neste capítulo são apresentados os resultados da análise de amostras de osso saudável, com doença óssea de Paget e com osteoporose. Apesar de a amostragem ser pequena, serão discutidas as diferenças registadas para as diferentes patologias e também a viabilidade e fiabilidade das diferentes técnicas e condições de análise. É particularmente importante garantir que a razão Ca/P e as concentrações dos restantes elementos são corretamente medidos já que a correlação entre a razão Ca/P e os elementos traço, que participam ativamente na remodelação óssea, pode constituir um biomarcador da saúde óssea, com menor dependência dos fatores intrínsecos e extrínsecos ao paciente.

Como referido, a análise de amostras ósseas por  $\mu$ -PIXE, na microsonda nuclear, permite uma análise da distribuição dos elementos no tecido ósseo. No entanto os resultados obtidos nas análises preliminares de amostras ósseas permitem verificar que não é possível mapear os elementos traço no osso por forma a distinguir uma alteração da distribuição destes elementos nos componentes do tecido ósseo. Por outro lado, a distribuição dos elementos maioritários não acrescenta informação relativamente à existente. Assim sendo, como não se justificava uma

análise de todas as amostras com micro-feixe, optou-se por uma análise das amostras por PIXE na câmara de reações nucleares. Dado que as amostras analisadas são amostras de osso trabecular, com imensas lacunas, a atenuação dos raios-X no interior da amostra é influenciada por efeitos geométricos, o que não acontece com amostras espessas de distribuição homogênea, como uma pastilha. No entanto, a análise de pastilhas de amostras de osso não substitui a análise de osso *in vivo*, pelo que neste trabalho só se aplicou pontualmente para estudar os efeitos geométricos. Estes são sobretudo importantes no caso do  $\mu$ -XRF por dois motivos: (a) os raios-X penetram mais na amostra (livre percurso médio dos raios-X para uma energia máxima de 50 keV em osso trabecular é 32.3 mm [168]) pelo que é feita essencialmente uma análise de volume e (b) a quantificação é feita por comparação com pastilhas de materiais de referência padrão com uma estrutura homogênea. Como exemplificado na figura 53, os prótons penetram muito menos na amostra, pelo que embora existam, estes efeitos geométricos da amostra na atenuação dos raios-X são menores. Quando se usa a técnica de PIGE para quantificação, estes problemas ficam bastante atenuados dado que, para além do alcance dos prótons ser de apenas alguns micrómetros, a atenuação da radiação gama (na ordem dos MeV) no seu trajeto para o exterior da amostra, é desprezável.

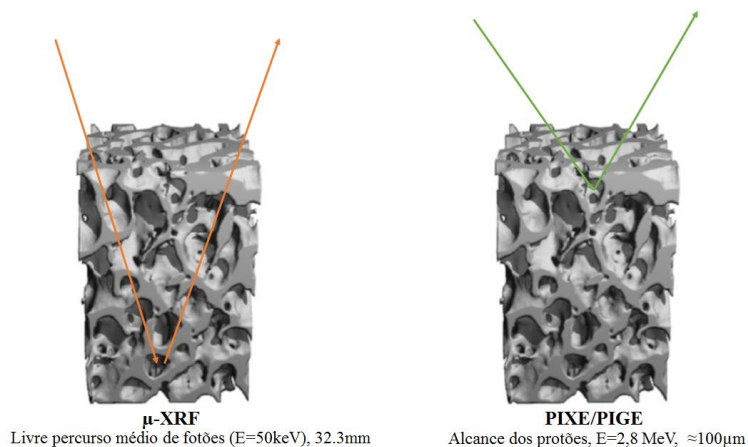


Figura 53) Livre percurso médio de fótons de energia 50 keV e alcance de prótons de 2.8 MeV em tecido trabecular [168].

# **Obtenção das Amostras Ósseas: Comissão de Ética e Consentimento Informado**

---

A obtenção de amostras ósseas requiere primeiro a apresentação de um pedido de autorização à comissão de ética do hospital com apresentação de um protocolo em que são apresentados os objetivos do estudo proposto e os procedimentos para recolha das amostras e carta de consentimento informado. Em primeiro lugar, o pedido de autorização para recolha das amostras ósseas foi entregue à comissão de ética do Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, onde foi obtida aprovação. No entanto, com o decorrer do trabalho constatou-se que o número de cirurgias em pacientes com DOP em todo o país era muito reduzida e que não haviam amostras de osso pagético no banco de ossos. Estendeu-se assim o pedido de autorização à comissão de ética do Hospital São João de Deus e do Centro Hospitalar do Barlavento Algarvio, tendo sido obtida aprovação de ambos os hospitais. O relatório apresentado à comissão de ética e as autorizações encontram-se no anexo 2. O próximo passo foi o contato com o diretor do serviço de ortopedia de cada hospital, em que foram explicados os objetivos do trabalho e entregue uma cópia do relatório que foi submetido à comissão de ética, a carta de consentimento informado, um questionário a ser preenchido pelo paciente e em que foram também definidos os parâmetros avaliados para seleção das cirurgias. Após consentimento informado do paciente, as amostras ósseas são coletadas durante a cirurgia quando, devido a causas clínicas ou acidentes é necessário remover partes do osso. As amostras são colocadas em recipientes de plástico e de imediato colocadas em local apropriado a uma temperatura de -80°C.

## Preparação das Amostras Ósseas

---

Todas as amostras ósseas foram preparadas no Instituto de Medicina Molecular. Foi feita uma perfuração cilíndrica nas amostras, como exemplificado na figura 48 (capítulo 5). Este corte cilíndrico é feito no sentido em que a carga mecânica é aplicada na cabeça do fémur. Os cilindros de osso foram posteriormente cortados em 8-10 secções com aproximadamente 2 mm de espessura e 1 cm de diâmetro. Estas secções foram depois lavadas com água destilada e colocadas no liofilizador por 24 h. As amostras foram catalogadas por forma a que à primeira secção do cilindro corresponda o número 1, à seguinte o número 2, e assim sucessivamente. Este tipo de preparação de amostras em que são analisadas várias amostras, cerca de 10, para cada tipo de osso, foi pensada, discutida e posta em prática, dado que não existe nenhuma descrição na literatura deste tipo de estudos. Para além disso, há evidências que sugerem que a doença óssea de Paget tem tendência a afetar sobretudo ossos que estão sujeitos a maiores cargas mecânicas, como é o caso dos ossos dos membros inferiores. Para além disso, a doença óssea de Paget afeta apenas um osso, ou vários ossos, mas não o esqueleto todo, como a osteoporose. Este tipo de estudos poderá também permitir verificar a extensão da doença no osso. Existe uma outra vantagem neste tipo de corte, que é o fato de que para algumas das referidas secções de osso ser possível analisar tecido da cartilagem (secção 1) e tecido trabecular (secções 2-10). É claro que, outro tipo de corte, talvez na longitudinal ao longo do osso também permitisse analisar estes dois tipos de tecido ósseo. No entanto, as amostras resultantes deste tipo de corte não seriam adequadas dadas as dimensões do porta-amostras e graus de liberdade de movimento do mesmo na câmara de reações nucleares do acelerador tandem.

# Condições Experimentais

---

## 1. Análises PIXE/PIGE

As amostras ósseas foram analisadas na câmara de reações nucleares do LATR-CTN/IST. Para tal foi usado um feixe de  $H^+$  com energia de 2.8 MeV, o que corresponde a aplicar no terminal do acelerador tandem uma tensão de 1400 kV. A corrente do feixe durante a análise foi mantida nos 10 nA, para não ‘queimar’ o osso e evitar um tempo morto elevado durante a análise. Para garantir uma boa quantificação é fundamental que a carga coletada seja bem medida. Para evitar os efeitos das descargas foi feita uma neutralização das amostras com canhão de elétrons. O canhão de elétrons foi ligado tendo-se ajustado uma corrente de  $\approx 250$  mA no filamento e uma tensão de  $\approx 230$  V na grelha de extração. A carga total coletada foi de  $5 \mu C$  (tempo de aquisição,  $\approx 10$  min). Para controlar que durante as análises não havia problemas de quantificação de carga, cada análise foi repetida mais uma ou duas vezes para garantir que os resultados eram reprodutíveis. As medidas foram realizadas em condições de alto vácuo,  $\sim 10^{-7}$  mbar. O porta-amostras permite que sejam montadas apenas 3 amostras de cada vez. A análise das amostras, dadas as limitações mecânicas e dado que o feixe tem  $\approx 2$  mm de diâmetro, é feita em três áreas distintas da amostra, como ilustrado na figura 54.



Figura 54) Imagem de uma amostra de osso com indicação das áreas onde é feita a análise.

Os espectros de raios-X e de radiação gama foram coletados simultaneamente tendo sido usado o software MPANT (*Multi Channel Analyzer da FAST ComTec*) que recebe os dados das ADCs (*analogic-to-digital converter*). Não foi possível coletar espectros de partículas pois o comprimento da manga do detetor de raios-X impossibilita a montagem dos detetores de

partículas na câmara de reações nucleares. A calibração do espectro de radiação gama foi feita com recurso a uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  no início de cada análise (riscas de 1.17 e 1.33 MeV). A calibração do espectro de raios-X foi feita com recurso a uma fonte de  $^{241}\text{Am}$ . Para efeitos de quantificação das análises de PIXE foi necessário introduzir os parâmetros do detetor no programa GUPIX o que implicou fazer medidas de materiais de referência padrão com valores certificados de concentração para alguns elementos e com valores aproximados, mas não certificados, para outros elementos. Os materiais analisados foram, materiais vidrados com concentrações tabeladas para vários elementos (*corning standards*), alvo de Au/Ag/Cu (90.0/9.5/0.5 %) e de pastilhas de materiais de referência padrão ou padrões de osso, termo que usarei doravante: (1) Bone Meal, NIST1486, (2) Bone Ash, NIST1400, (3) NYS RM 05-01 Lead in Bovine Bone e (4) NYS RM 05-04 Lead in Caprine Bone. Dado que o cálcio surge no espectro na forma de um pico muito intenso fazendo com que os limites de detecção sejam baixos para elementos de Z elevado, e dado que os padrões de osso têm concentrações de cálcio bastante elevadas, a análises destes padrões serviu para fazer alguns ajustes na geometria de detecção por forma a melhorar a análise. Em primeiro lugar foi ajustada a posição do detetor, dado que a distância do mesmo à amostra é regulável (figura 22), tendo o detetor ficado a 97 mm da amostra, para garantir um tempo morto inferior a 5%, para o que contribuiu também um filtro de mylar com 350  $\mu\text{m}$  em frente ao detetor.

Posteriormente e para determinar a exatidão da técnica para análise das amostras ósseas, foram analisados os referidos materiais de referência padrão. Nas tabelas que se seguem são apresentados os resultados de PIXE e de PIGE para o alvo de Au/Ag/Cu (tabela 9) e para dois padrões de osso (tabelas 10 e 11). A técnica de PIGE foi aplicada para quantificação do fósforo. As concentrações de todos os outros elementos foram obtidas por PIXE. O desvio apresentado foi calculado com base na média dos valores para as várias energias ( $v_{med}$ ) e no valor do certificado ( $v_{cert}$ ) aplicando a expressão  $\left(\frac{|v_{med}-v_{cert}|}{v_{cert}}\right) \times 100$ . No anexo 3 são apresentados mais resultados da análise dos *Corning Standards*. As análises foram feitas para várias energias do feixe incidente para identificação das condições experimentais mais adequadas à análise de elementos pesados.

	Alvo Au/Ag/Cu											
		2000 keV			2197 keV			2788 keV			Certificado	Desvio
Concentração (% m/m)	Cu	0.6	±	0.1	0.5	±	0.1	0.6	±	0.1	0.5	13.3 %
	Ag	8.9	±	0.7	8.9	±	0.8	9.6	±	0.7	9.5	3.9%
	Au	90.6	±	0.2	90.6	±	0.4	89.9	±	0.3	90.0	0.4%

Tabela 9) Resultados da análise por PIXE de um alvo de Au /Ag /Cu (90.0/9.5/0.5 %).

	Caprine Bone						
		2611.1 keV	2787.8 keV	2986.6 keV	3775.4 keV	Certificado	Desvio
Concentração (% m/m)	Ca	26.3 ± 1.7	26.5 ± 0.4	26.4 ± 0.8	24.5 ± 1.5	26.4	1.8%
	P	-	12.7 ± 0.4	12.7 ± 0.4	12.6 ± 0.4	12.5	1.3%
Concentração (µg/g)	Zn	84 ± 15	89 ± 12	100 ± 12	83 ± 13	81	9.5%
	Sr	103 ± 29	109 ± 21	191 ± 24	111 ± 20	150	14.4%

Tabela 10) Resultados da análise por PIXE e PIGE do padrão Caprine Bone usando um feixe de prótons com energias 2611.1 keV, 2787.8 keV, 2986.6 keV e 3775.4 keV. São também indicados os valores do certificado. Este padrão está certificado apenas para o chumbo.

	Bone Meal						
		2611.1 keV	2787.8 keV	2986.6 keV	3775.4 keV	Certificado	Desvio
Concentração (% m/m)	Ca	27.9 ± 1.5	25.9 ± 1.8	24.2 ± 0.7	23.4 ± 0.5	26.58 ± 0.24	4.6%
	P	-	11.5 ± 0.3	12.2 ± 0.4	11.4 ± 0.3	12.3 ± 0.19	4.9 %
Concentração (µg/g)	Zn	186 ± 22	178 ± 23	171 ± 15	169 ± 9	147 ± 16	9.4%
	Sr	282 ± 44	274 ± 53	246 ± 33	255 ± 17	264 ± 7	0.1%

Tabela 11) Resultados da análise por PIXE e PIGE do padrão Bone Meal usando um feixe de prótons com energias 2611.1 keV, 2787.8 keV, 2986.6 keV e 3775.4 keV. São também indicados os valores do certificado.

Tal como referido anteriormente, os materiais de referência padrão estão certificados apenas para alguns elementos. No certificado existem também valores de concentração não certificados para outros elementos. Estes são valores aproximados fornecidos pelo fabricante, que têm por isso uma incerteza associada sempre superior, pelo que mesmo que os nossos valores não sejam exatamente iguais, mas desde que sejam aproximados, não invalida de forma alguma a viabilidade das técnicas para este tipo de análises. De um modo geral, para a maioria dos elementos e para todas as energias, registou-se uma boa concordância entre os valores experimentais e os valores do certificado, pelo que os resultados validam a aplicação das técnicas para a análise pretendida.



Para quantificação do fósforo foi necessário calcular a área do pico correspondente à radiação gama de 1266 keV da reação de dispersão inelástica do fósforo já referida, e esta informação foi introduzida no código ERYA que tendo uma base de dados com todas as secções eficazes disponíveis, o ficheiro da eficiência do detetor e o ficheiro com os parâmetros de Ziegler, consegue fornecer os valores de concentração deste elemento aplicando a metodologia descrita no subcapítulo 2.2. Como a secção eficaz do fósforo foi calculada apenas para energias compreendidas entre os 2.6 MeV e os 4 MeV, foi necessário analisar todas as amostras para uma energia de 2.6 MeV para determinação do rendimento gama a esta energia. Este rendimento é depois subtraído ao rendimento gama obtido para as outras energias de análise, para efeitos do cálculo de concentrações do ERYA.

Como referido anteriormente, dado que o feixe usado para irradiar a amostra tem um diâmetro da ordem dos 2 mm e dadas as limitações do porta-amostras, foram feitas análises em três áreas diferentes para cada amostra (figura 54). Os resultados que serão apresentados correspondem à média aritmética desses valores e a incerteza é calculada com base no desvio padrão dos valores experimentais e na incerteza associada a cada medida. A incerteza associada à quantificação por PIXE é a incerteza combinada calculada com os valores da incerteza do ajuste e da incerteza experimental que são fornecidos no ficheiro de output do GUPIXFIT. A incerteza associada à quantificação do fósforo depende de vários fatores nomeadamente da incerteza do cálculo da área e da incerteza estatística. A incerteza estatística foi calculada aplicando a expressão,  $\frac{\sqrt{Integral}}{Área}$ . A incerteza associada à extração da área é muito inferior à estatística, dado que não existem interferências de outros picos na vizinhança do pico de 1266 keV nem limiares de *Compton* relacionados com outros picos intensos no espectro. Como a secção eficaz usada na quantificação foi calculada na câmara de reações nucleares a incerteza associada à eficiência do detetor (5%) cancela. Posto isto, a incerteza associada à medida é dada pela incerteza estatística e pela incerteza associada ao valor absoluto da carga. Os resultados de alguns testes feitos anteriormente em que foram registados o rendimento de partículas retrodispersas mostram que em valor absoluto a carga é bem conhecida com uma incerteza de  $\pm 5\%$  (equação 4.7).

A análise dos espectros de raios-X dos materiais de referência padrão permite verificar que o aumento da energia do feixe não contribui para um aumento dos limites de deteção dos elementos de Z elevado, como deveria acontecer. Isto deve-se ao aumento do fundo debaixo dos picos correspondentes a esses elementos que é essencialmente devido ao Compton das reações nucleares (que produzem radiação gama) induzidas nos elementos leves do alvo. As

secções eficazes destas reações aumentam com a energia. Por outro lado, a secção eficaz de produção de raios-X para o cálcio aumenta na gama de energias analisadas o que contribui para um aumento do tempo morto embora este efeito possa ser compensado com a utilização de filtros adicionais. Por este motivo, para as energias de análise utilizadas não foi possível quantificar o chumbo no material de referência padrão Caprine Bone ( $31.5 \pm 0.7 \mu\text{g/g}$ ).

## 2. Análises $\mu$ -XRF

As análises de  $\mu$ -XRF foram realizadas no espectrómetro M4-Tornado da Bruker na FCT-UNL. Todas as amostras foram analisadas em duas condições diferentes de operação do tubo, 50 kV, 100  $\mu\text{A}$  sem filtros e 50 kV, 600  $\mu\text{A}$  com um filtro de Al/Ti/Cu – 100/50/25  $\mu\text{m}$ .

Para cada amostra, as análises foram feitas em cinco áreas diferentes. Nas amostras de osso saudável, osso osteoporótico 2 e osso com DOP foram feitas 10 análises em áreas diferentes para cada amostra exceto na última em que a análise foi feita em 30 áreas diferentes. Os valores apresentados para cada amostra correspondem à média pesada dos valores obtidos e a incerteza é calculada com base no desvio padrão dos valores obtidos para a concentração e a incerteza associada a cada um destes valores.

Como mencionado anteriormente, a quantificação foi feita por *compare mode*, que faz uso de uma reta de calibração calculada com base na análise de materiais de referência padrão: (1) Bone Meal, NIST1486, (2) Bone Ash, NIST1400, (3) NYS RM 05-01 Lead in Bovine Bone e (4) NYS RM 05-04 Lead in Caprine Bone. Estes materiais são adquiridos na forma de pó que é agitado para homogeneização e depois prensado numa prensa hidráulica ficando na forma de pastilha homogénea. Para aferição da reta de calibração, estes materiais de referência padrão foram analisados no espectrómetro M4-Tornado tendo a análise sido feita em três áreas diferentes da amostra. A escolha de três áreas pareceu suficiente dado que a amostra é essencialmente homogénea. A cada área correspondente a uma risca de um dado elemento, está associada uma determinada concentração, dada pelo certificado, obtendo-se assim a reta de calibração. Depois de feitas as análises nos materiais de referência padrão e calculada a reta de calibração, os padrões foram novamente analisados nas duas condições de operação descritas. As tabelas 12 e 13 mostram o resultado da quantificação para os referidos materiais de referência padrão, decorrentes da análise sem filtro. As tabelas 14 e 15 mostram o resultado das análises com filtros. A medição dos materiais de referência padrão é uma medida da exatidão

da técnica que pode ser obtida por comparação do resultado experimental da análise com o valor do certificado. O desvio apresentado é calculado com base no valor medido e no valor experimental e é dado por  $\left(\frac{|v_{med}-v_{cert}|}{v_{cert}}\right) \times 100$ . A qualidade da medição é aferida pela equivalência estatística entre os valores estimados e observados. As análises com filtro e sem filtro mostram-se concordantes para amostras de distribuição homogênea.

		Bone Ash			Bone Meal		
		Experimental	Certificado	Desvio (%)	Experimental	Certificado	Desvio (%)
Concentração (%m/m)	P	17.3±1.0	17.91±0.19	3.4	13.0±0.8	12.30±0.19	5.7
	Ca	33.0±3.0	38.18±0.13	13.6	28.3±3.1	26.58±0.24	6.5
	Mg	0.69±0.11	0.684±0.013	0.9	0.48±0.08	0.466±0.017	3.0
Concentração (µg/g)	Zn	163±32	181±3	10.0	140±21	147±16	4.8
	Sr	200±31	249±7	19.7	263±42	264±7	0.4

Tabela 12) Resultados da análise dos materiais de referência padrão, Bone Ash e Bone Meal e comparação com os valores do certificado nas condições de análise sem filtros.

		Bovine Bone			Caprine Bone		
		Experimental	Certificado	Desvio (%)	Experimental	Certificado	Desvio (%)
Concentração (%m/m)	P	11.7±0.8	12.0	2.5	13.0±0.8	12.5	4.0
	Ca	26.3±3.1	26.0	1.2	29.0±3.0	26.4	9.9
	Mg	0.31±0.09	0.42	26.2	0.42±0.09	0.43	2.3
Concentração (µg/g)	Zn	83±22	80	3.8	90±12	81	11.1
	Sr	177±31	160	10.6	173±21	150	15.3

Tabela 13) Resultados da análise dos materiais de referência padrão, Bovine Bone e Caprine Bone e comparação com os valores do certificado nas condições de análise sem filtros.

		Bone Ash			Bone Meal		
		Experimental	Certificado	Desvio (%)	Experimental	Certificado	Desvio (%)
Concentração (%m/m)	P	18.0±4.0	17.91±0.19	0.5	13.5±1.1	12.30±0.19	9.8
	Ca	32.0±4.0	38.18±0.13	16.2	29.0±4.1	26.58±0.24	9.1
Concentração (µg/g)	Zn	153±23	181±3	15.5	157±21	147±16	6.8
	Sr	210±58	249±7	15.7	280±52	264±7	6.1
	Pb	10.7±3.1	9.07±0.12	18.0	-	-	-

Tabela 14) Resultados da análise dos materiais de referência padrão, Bone Ash e Bone Meal e comparação com os valores do certificado nas condições de análise com filtros.

		Bovine Bone			Caprine Bone		
		Experimental	Certificado	Desvio (%)	Experimental	Certificado	Desvio (%)
Concentração (%m/m)	P	12.5±3.1	12.0	4.2	12.7±3.1	12.5	1.6
	Ca	27.3±4.3	26.0	5.0	27.0±3.0	26.4	2.3
Concentração (µg/g)	Zn	83±11	80	3.8	87±11	81	7.4
	Sr	173±31	160	8.1	157±31	150	4.7
	Pb	16.0±5.0	16.1±0.3	0.6	29.0±8.0	31.5±0.7	8.0

Tabela 15) Resultados da análise dos materiais de referência padrão, Bovine Bone e Caprine Bone e comparação com os valores do certificado nas condições de análise com filtros.

A análise dos materiais de referência padrão e das amostras de osso com filtros, foi feita para análise e quantificação do chumbo. Nas análises sem filtros não era possível quantificar este elemento. A aplicação de filtros faz aumentar a secção eficaz do efeito fotoelétrico dos elementos de Z mais elevado melhorando os seus limites de deteção.

### 3. Resultados da Análise das Amostras de Osso

#### A. Osso Saudável

São apresentados os resultados da análise de uma amostra de osso saudável de um paciente do sexo masculino, com 52 anos de idade, residente no Alentejo. As tabelas 16, 17 e 18 mostram os valores da concentração de cálcio, fósforo, zinco, estrôncio e da razão Ca/P, obtidas por PIXE, PIGE e por  $\mu$ -XRF nas duas condições de análise já descritas. No caso dos resultados de  $\mu$ -XRF são apresentadas as concentrações de Ca e P obtidas pela análise 50 kV, 100  $\mu$ A sem filtros, doravante designadas simplesmente por análises sem filtros. Os valores das concentrações de Zn, Sr e Pb apresentados, foram obtidas pela análise 50 kV, 600  $\mu$ A com filtro de Al/Ti/Cu – 100/50/25  $\mu$ m, doravante designadas simplesmente por análises com filtros. Os valores apresentados para a razão Ca/P correspondem à média dos valores obtidos para cada uma das análises e a incerteza é calculada com base na dispersão dos resultados. Neste osso, não foi possível aproveitar a primeira secção que corresponde a tecido da cartilagem. As secções 5 e 6 não foram analisadas pois foram usadas numa das tentativas de fazer uma pastilha de osso saudável para estudo dos efeitos geométricos como será explicado mais adiante.

PIXE/PIGE															
	Conc. de Ca (%m/m)			Conc. de P (%m/m)			Ca/P			Conc. de Zn (µg/g)			Conc. de Sr (µg/g)		
1															
2	9.9	±	2.0	4.5	±	0.5	2.2	±	0.3	105.0	±	22.0	-	-	-
3	11.0	±	0.7	4.7	±	0.2	2.4	±	0.2	123.0	±	15.0	-	-	-
4	12.7	±	0.9	7.1	±	0.2	1.8	±	0.2	132.0	±	14.0	48.0	±	20.0
5															
6															
7	13.0	±	1.0	7.2	±	0.2	1.8	±	0.1	134.0	±	37.0	35.0	±	21.0
8	18.8	±	1.1	10.3	±	0.2	1.8	±	0.1	188.0	±	23.0	48.0	±	22.0

Tabela 16) Resultados da análise de uma amostra de osso saudável por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do LATR-CTN/IST. A concentração de Ca, Zn e Sr para as várias secções foram obtidas por PIXE. A concentração de P foi obtida por análise PIGE. As células a sombreado correspondem a secções de osso não analisadas.

	Conc. de Ca (%m/m)			Conc. de P (%m/m)			Conc. de K (µg/g)			Ca/P		
1												
2	22.1	±	3.4	9.1	±	1.3	203.0	±	35.0	2.4	±	0.3
3	18.0	±	2.3	6.5	±	0.6	93.0	±	18.0	2.7	±	0.3
4	24.1	±	2.8	7.1	±	0.9	140.0	±	26.0	2.6	±	0.2
5	24.4	±	2.7	9.1	±	0.9	176.0	±	46.0	2.7	±	0.2
6	23.4	±	2.7	9.1	±	0.9	178.0	±	37.0	2.6	±	0.3
7	21.3	±	1.4	9.1	±	0.5	138.0	±	28.0	2.4	±	0.2
8	23.1	±	1.1	9.6	±	0.4	172.0	±	29.0	2.6	±	0.2

Tabela 17) Concentrações de cálcio, fósforo e potássio e razão Ca/P obtidas para todas as secções de osso saudável por µ-XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker na FCT/UNL. As células a sombreado correspondem a secções de osso não analisadas.

	Conc. de Zn (µg/g)			Conc. de Sr (µg/g)			Conc. de Pb (µg/g)		
1									
2	167.6	±	22.9	65.9	±	11.7	8.3	±	1.3
3	157.1	±	19.8	64.7	±	11.1	8.5	±	1.4
4	249.3	±	34.6	81.7	±	11.6	8.0	±	2.1
5	186.2	±	17.6	70.9	±	6.9	10.0	±	2.0
6	204.4	±	14.0	79.1	±	6.4	7.0	±	2.0
7	198.3	±	27.1	59.3	±	6.5	7.3	±	0.9
8	222.6	±	16.1	73.9	±	23.8	7.5	±	0.5

Tabela 18) Concentrações de zinco, estrôncio e chumbo, obtidas para todas as secções de osso saudável por µ-XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker na FCT/UNL. As células a sombreado correspondem a secções de osso não analisadas.

Relativamente ao cálcio, os valores de concentração encontrados na literatura especificamente para a faixa etária dos 51-55 anos, em que se insere a amostra analisada são  $16.7 \pm 3.4$  em % m/m [6] para osso trabecular saudável. Os resultados obtidos por PIXE estão concordantes dentro da incerteza com estes valores. Apenas as secções de osso números 2 e 3 apresentam concentrações ligeiramente inferiores. Os resultados de PIXE permitem também verificar que na secção número 2 a concentração de cálcio é inferior à das restantes amostras. Por norma, a primeira secção, que não foi possível analisar neste caso, é cartilagem. A cartilagem tem uma extensão de aproximadamente 1.50-1.78 mm de espessura [169], pelo que a amostra número 2 poderá conter ainda tecido da cartilagem. Dado que os protões para a referida energia de análise têm um alcance de cerca de uma centena de micrómetros em tecido da cartilagem, e visto que a cartilagem é menos mineralizada do que o tecido trabecular, este pode ser o motivo pelo qual se observou a diferença na concentração de cálcio na segunda secção. No caso do  $\mu$ -XRF tal não se verifica visto que os raios-X atravessam todo o volume da amostra.

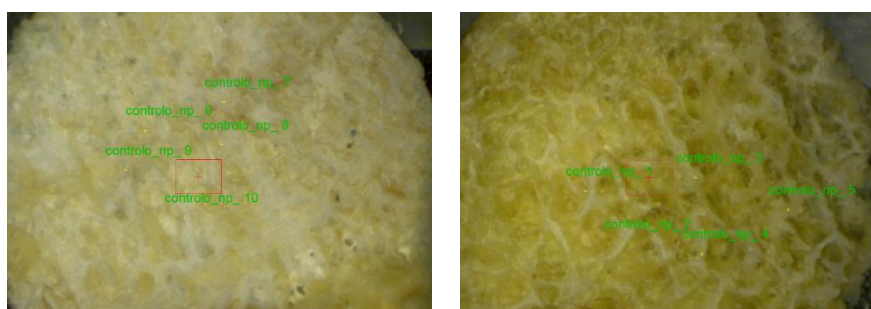


Figura 55) Imagem do microscópio do espectrómetro M4-Tornado da Bruker, das amostras 2 (esquerda) e 8 (direita) do osso saudável.

O gráfico da figura 56 permite ver a concentração de cálcio obtida para todas as secções por PIXE e por  $\mu$ -XRF. Verifica-se que a concentração de cálcio obtida por PIXE é inferior, para todas as amostras, à obtida por  $\mu$ -XRF e tal pode dever-se a vários fatores, nomeadamente aos fatores geométricos da amostra e às diferenças de uma análise com partículas carregadas e raios-X. Este assunto será discutido em detalhe mais adiante.

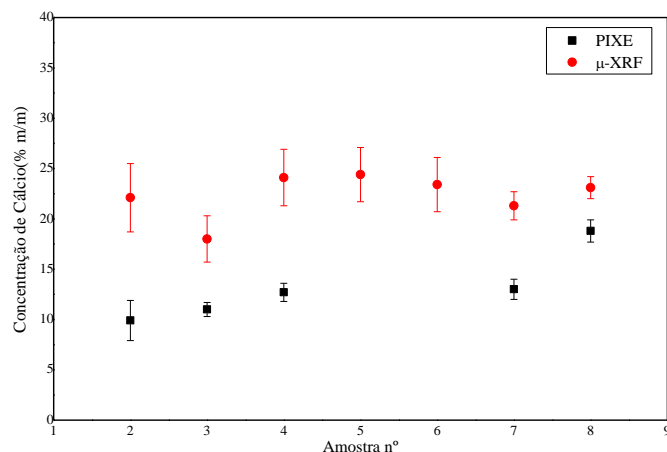


Figura 56) Gráfico da concentração de cálcio (% m/m) para cada uma das secções analisadas de osso saudável.

Relativamente ao fósforo a mesma referência [6] apresenta valores de  $8.07 \pm 2.00$  (%m/m) para a faixa etária 51 – 55 anos. Como é possível constatar pela análise das tabelas 16 e 17, estes valores estão de acordo com os resultados obtidos por PIGE e por  $\mu$ -XRF. As diferenças entre as duas técnicas são mais pronunciadas para as secções números 2, 3 e 7. Para as secções 2 e 3 (tabela 16) obtém-se uma concentração de fósforo inferior por comparação com as restantes amostras e ligeiramente abaixo da gama de valores encontrada na literatura [6], [21]. Por comparação com os resultados obtidos para o cálcio, a concentração de fósforo parece ser mais variável no tecido ósseo.

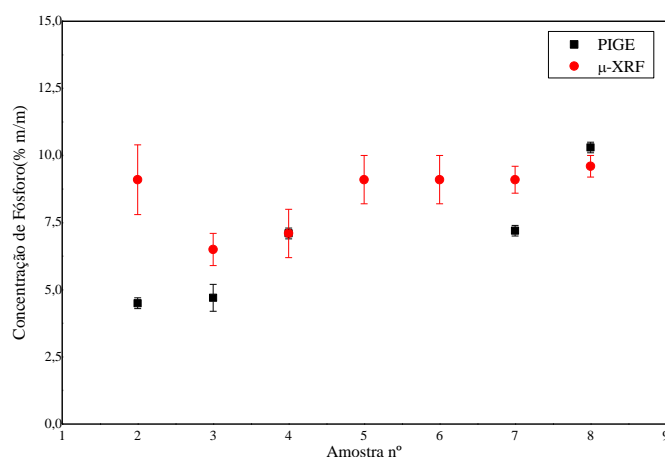


Figura 57) Gráfico da concentração de fósforo (% m/m) para cada uma das secções analisadas de osso saudável.

Os valores de zinco publicados na literatura para osso esponjoso saudável,  $139 \pm 17$   $\mu\text{g/g}$  [17] e  $90 \pm 15$  [4] são concordantes com os valores obtidos por PIXE, registando-se um valor

superior apenas para a última secção. As concentrações de zinco são muito variáveis e os resultados publicados na literatura encontram-se no intervalo 25 a 265  $\mu\text{g/g}$  [21], e esta variabilidade deve-se ao fato deste elemento depender de diversos fatores como nutrição, metabolismo e ambiente. Por  $\mu\text{-XRF}$  a análise foi feita em dez áreas diferentes de cada secção de osso tendo-se verificado uma grande variabilidade na distribuição deste elemento em cada amostra, o que está de acordo com os resultados da literatura [21]. Os valores de  $\mu\text{-XRF}$ , como é possível ver pela análise da figura 58, são superiores aos obtidos por PIXE para todas as amostras. Apesar de os limites de deteção para o estrôncio, para o detetor de raios-X usado nas análises PIXE, serem relativamente pobres, o que se reflete em incertezas associadas à medida bastante elevadas, verifica-se mais uma vez que as concentrações deste elemento por PIXE são inferiores às obtidas por  $\mu\text{-XRF}$ . Os valores estão de acordo com valores publicados na literatura, nomeadamente,  $47.7 \pm 14.3 \mu\text{g/g}$  [16] e dentro da gama de valores 50-420  $\mu\text{g/g}$  referidos na referência [21].

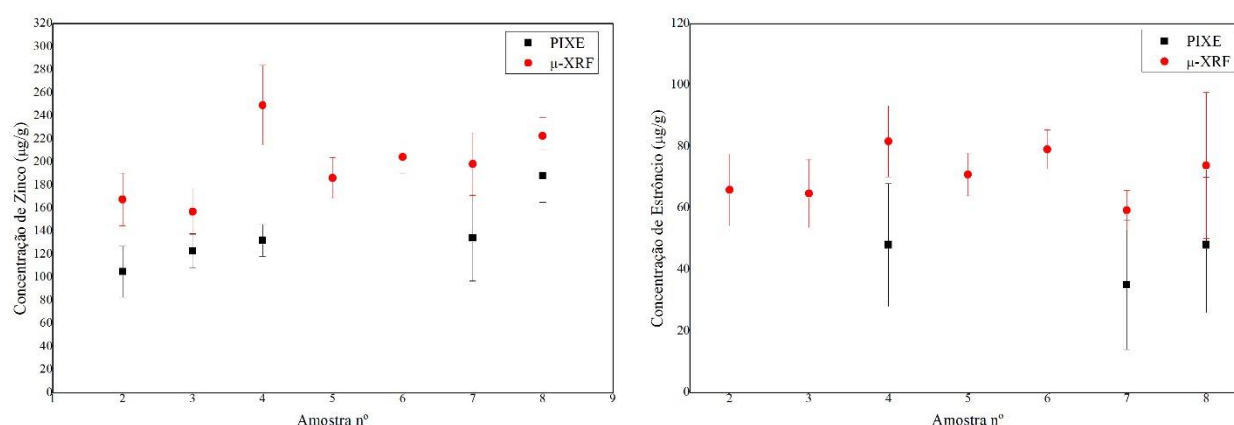


Figura 58) Gráfico da concentração de zinco ( $\mu\text{g/g}$ ) e de estrôncio ( $\mu\text{g/g}$ ) para cada uma das secções analisadas de osso saudável.

Os valores encontrados na literatura para a razão Ca/P para idades compreendidas entre os 51 e os 55 anos para o género masculino, são de  $2.42 \pm 0.31$  [96] e  $2.03 \pm 0.24$  [17]. Embora os resultados obtidos por PIXE sejam inferiores aos registados por  $\mu\text{-XRF}$ , os resultados de ambas as técnicas estão de acordo com os valores da literatura.



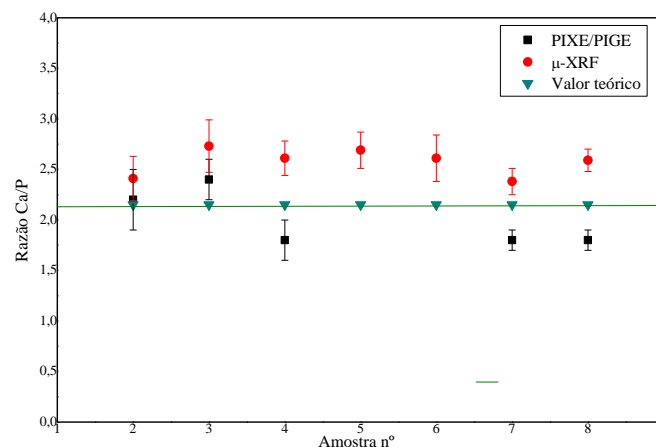


Figura 59) Gráfico da razão Ca/P para cada uma das secções analisadas de osso saudável. A incerteza associada ao valor da razão Ca/P em cada análise é determinada a partir das incertezas associadas ao valor da concentração do cálcio e do fósforo. Os valores apresentados para cada secção correspondem à média das análises feitas em cada secção e a incerteza traduz a dispersão dos valores das análises.

De relemburar, que a quantificação no caso do  $\mu$ -XRF é feita através de uma reta de calibração calculada com base na análise de pastilhas de materiais de referência padrão, o que é bastante diferente da estrutura do osso trabecular, que tem imensos buracos. Para tentar perceber de que forma estes efeitos geométricos da amostra podem influenciar as análises, foi feita uma pastilha a partir de algumas secções do osso de controlo e os resultados serão discutidos mais adiante.

As secções de osso foram também analisadas por PIXE e PIGE para a energia de aproximadamente 2600 keV pelos motivos anteriormente referidos. Algumas secções de osso foram analisadas a aproximadamente 3500 keV, para tentar perceber se aumentando a energia era possível excitar elementos mais pesados na amostra e obter mais informação sobre esses elementos. Para além disso, a secção eficaz para as reacções de dispersão inelástica,  $^{31}\text{P}(p, p'\gamma)P^{31}$  e  $^{25}\text{Mg}(p, p'\gamma)\text{Mg}^{25}$  aumentam com a energia. No Anexo 4 encontram-se as tabelas com os resultados destas análises elementares para as secções números 2 e 8.

As análises a diferentes energias mostram uma boa concordância embora, tal como referido, não tenha contribuído para uma melhor informação espectral no caso das análises PIXE. De referir também, que as análises a diferentes energias foram feitas em dias diferentes, pelo que a análise não foi feita exatamente na mesma área da amostra, o que pode induzir alguma variabilidade nos resultados.

A secção número 8 foi também analisada na microsonda nuclear por  $\mu$ -PIXE. A análise foi feita com um feixe de  $H^+$  com energia 1000 keV produzido pelo acelerador Van de Graaff. As condições experimentais das análises na microsonda nuclear estão descritas em detalhe no subcapítulo 3.3. A carga foi determinada com rigor por ajuste dos espectros de  $\mu$ -EBS coletados simultaneamente, com recurso ao programa WiNDF. Na tabela 19 encontram-se os resultados da análise por  $\mu$ -PIXE.

<b>Concentração (%m/m)</b>	Ca	17.8	$\pm$	0.8
	P	8.6	$\pm$	0.4
	Na	0.44	$\pm$	0.04
	Mg	0.24	$\pm$	0.02
	Ca/P	2.1	$\pm$	0.1
<b>Concentração (<math>\mu</math>g/g)</b>	Cl	250	$\pm$	44
	S	1454	$\pm$	145

Tabela 19) Resultados da análise da secção número 8 de osso saudável por  $\mu$ -PIXE na microsonda nuclear no LATR-CTN/IST. A análise foi feita em vários pontos na secção de osso e o valor apresentado é o valor médio das concentrações registadas e a incerteza traduz a dispersão dos resultados.

Também foi possível quantificar o sódio por PIGE, para a reação de dispersão inelástica  $^{23}Na(p, p'\gamma)Na^{23}$  para o canal de saída,  $\gamma = 440 \text{ keV}$ . Este valor foi calculado para a análise a 2800 keV e obteve-se o resultado  $0.53 \pm 0.03$  em % m/m. Obteve-se também o valor da concentração de flúor,  $0.37 \pm 0.03$  em % m/m, a partir do rendimento gama para a reação  $^{19}F(p, p'\gamma)F^{19}$  ( $\gamma = 197 \text{ keV}$ ). Para uma energia de 3500 keV foi possível quantificar o magnésio por PIGE, a partir da radiação gama de 584 keV correspondente à reação de dispersão inelástica  $^{25}Mg(p, p'\gamma)Mg^{25}$ , tendo-se obtido o valor  $0.17 \pm 0.03$  em %m/m. Estes valores são concordantes com os apresentados na tabela 19 já que o  $\mu$ -PIXE corresponde a uma análise focada numa área pequena enquanto que a análise PIGE é feita numa área comparativamente maior. Os resultados de cálcio obtidos por  $\mu$ -PIXE (à escala dos  $\mu$ m) são concordantes com os resultados de PIXE/PIGE (escala dos mm), indicando uma distribuição homogénea do cálcio no tecido ósseo. Por outro lado, o mesmo não foi possível concluir para o fósforo, o que pode justificar a pequena discrepância registada para este elemento quando comparados os resultados das duas técnicas.

## B. Doença Óssea de Paget

Nas tabelas que se seguem são apresentados os resultados para as concentrações do Ca, P, Zn e Sr e da razão Ca/P obtidos nas análises por PIXE, PIGE e  $\mu$ -XRF. Os valores apresentados para cada secção de osso correspondem ao valor médio dos resultados obtidos e as incertezas associadas resultam da dispersão dos resultados.

	[Ca] (%m/m)			[P] (%m/m)			Ca/P			[Zn] ( $\mu$ g/g)			[Sr] ( $\mu$ g/g)			[Pb] ( $\mu$ g/g)		
<b>1</b>	21.0	$\pm$	1.3	4.8	$\pm$	0.4	4.6	$\pm$	0.7	356	$\pm$	28	83	$\pm$	24	-	-	-
<b>2</b>	31.6	$\pm$	1.1	6.3	$\pm$	0.2	5.0	$\pm$	0.3	461	$\pm$	32	102	$\pm$	32	102	$\pm$	39
<b>3</b>	26.2	$\pm$	0.6	6.6	$\pm$	0.2	4.0	$\pm$	0.2	407	$\pm$	62	68	$\pm$	22	-	-	-
<b>4</b>	28.9	$\pm$	0.6	6.0	$\pm$	0.3	4.6	$\pm$	0.3	287	$\pm$	24	94	$\pm$	32	-	-	-
<b>5</b>	24.9	$\pm$	0.6	6.2	$\pm$	0.2	4.0	$\pm$	0.3	358	$\pm$	34	105	$\pm$	28	-	-	-
<b>6</b>	32.7	$\pm$	1.6	8.1	$\pm$	0.1	4.1	$\pm$	0.2	400	$\pm$	37	120	$\pm$	46	-	-	-
<b>7</b>	26.2	$\pm$	0.9	5.4	$\pm$	0.2	4.8	$\pm$	0.3	340	$\pm$	22	90	$\pm$	28	-	-	-
<b>8</b>	25.5	$\pm$	1.4	7.6	$\pm$	0.4	3.4	$\pm$	0.2	303	$\pm$	28	93	$\pm$	31	-	-	-
<b>9</b>	19.1	$\pm$	2.0	6.3	$\pm$	1.0	3.1	$\pm$	0.3	367	$\pm$	30	83	$\pm$	30	-	-	-
<b>10</b>	19.4	$\pm$	0.6	7.8	$\pm$	1.2	2.2	$\pm$	0.1	288	$\pm$	34	107	$\pm$	38	-	-	-

Tabela 20) Resultados da análise da amostra com doença óssea de Paget por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST. Só foi possível quantificar o chumbo para a secção número 2.

	[Ca] (% m/m)			[P] (%m/m)			[K] ( $\mu$ g/g)			Ca/P		
<b>1</b>	21.0	$\pm$	2.0	6.4	$\pm$	0.6	263	$\pm$	36	4.3	$\pm$	0.4
<b>2</b>	27.0	$\pm$	3.0	10.9	$\pm$	0.9	213	$\pm$	32	2.4	$\pm$	0.2
<b>3</b>	19.3	$\pm$	1.8	7.9	$\pm$	0.6	115	$\pm$	18	2.4	$\pm$	0.2
<b>4</b>	19.4	$\pm$	1.6	7.9	$\pm$	0.6	96	$\pm$	12	2.5	$\pm$	0.2
<b>5</b>	23.0	$\pm$	3.0	9.0	$\pm$	1.0	160	$\pm$	19	3.0	$\pm$	0.4
<b>6</b>	19.4	$\pm$	1.8	7.9	$\pm$	0.7	117	$\pm$	19	2.6	$\pm$	0.2
<b>7</b>	21.0	$\pm$	2.0	8.4	$\pm$	0.9	170	$\pm$	30	2.7	$\pm$	0.3
<b>8</b>	17.9	$\pm$	1.4	7.5	$\pm$	0.5	107	$\pm$	14	2.4	$\pm$	0.2
<b>9</b>	20.4	$\pm$	3.2	8.2	$\pm$	1.2	186	$\pm$	37	2.8	$\pm$	0.3
<b>10</b>	22.3	$\pm$	1.3	9.6	$\pm$	0.6	144	$\pm$	11	3.2	$\pm$	0.3

Tabela 21) Concentrações de cálcio, fósforo e potássio e razão Ca/P obtidas para todas as secções de osso com doença óssea de Paget por  $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker na FCT/UNL.

	[Zn] ( $\mu\text{g/g}$ )			[Sr] ( $\mu\text{g/g}$ )			[Pb] ( $\mu\text{g/g}$ )		
<b>1</b>	257	$\pm$	24	79	$\pm$	6	75	$\pm$	16
<b>2</b>	324	$\pm$	32	96	$\pm$	8	26	$\pm$	10
<b>3</b>	201	$\pm$	21	46	$\pm$	5	18	$\pm$	7
<b>4</b>	158	$\pm$	13	40	$\pm$	5	14	$\pm$	4
<b>5</b>	241	$\pm$	32	62	$\pm$	8	16	$\pm$	5
<b>6</b>	193	$\pm$	17	70	$\pm$	9	17	$\pm$	3
<b>7</b>	213	$\pm$	25	81	$\pm$	11	14	$\pm$	2
<b>8</b>	187	$\pm$	16	53	$\pm$	6	13	$\pm$	2
<b>9</b>	209	$\pm$	30	75	$\pm$	9	15	$\pm$	2
<b>10</b>	185	$\pm$	28	76	$\pm$	22	20	$\pm$	2

Tabela 22) Concentrações de zinco, estrôncio e chumbo para todas as secções de osso com doença óssea de Paget por  $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker na FCT/UNL.

No osso com DOP foi possível quantificar chumbo, um elemento muito tóxico com grande afinidade para o osso e que afeta diretamente as funções das células ósseas. É fácil constatar que na primeira secção de osso, cartilagem (figura 60), a concentração de chumbo é mais elevada. Nas restantes secções a concentração de chumbo é aproximadamente constante e acima dos valores registados para a amostra de osso saudável que é inferior a  $10 \mu\text{g/g}$  para todas as secções de osso. Os valores encontrados são em média também bastante superiores aos registados para os ossos osteoporóticos.

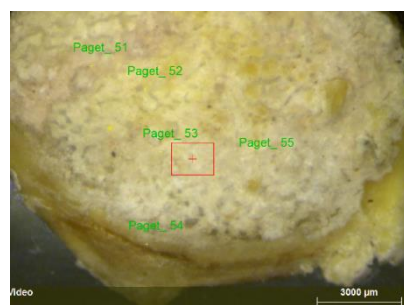
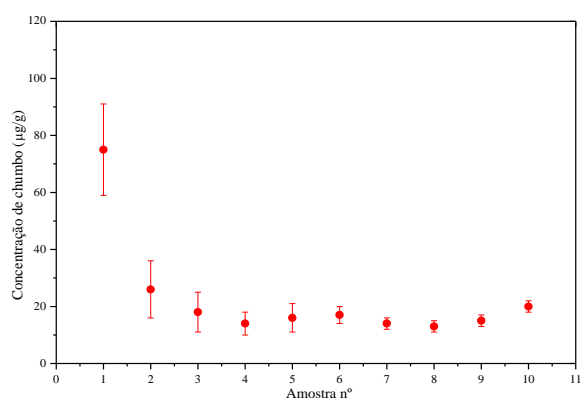


Figura 60) Gráfico da concentração de chumbo ( $\mu\text{g/g}$ ) para cada secção do osso pagético (esquerda) e imagem da primeira secção de osso com DOP (direita).

Para a maioria das amostras as concentrações de cálcio obtidas por PIXE são superiores às obtidas por  $\mu$ -XRF e são superiores às registadas para o osso saudável. De salientar que, embora se tenha registado para a primeira secção (cartilagem), uma concentração de cálcio inferior às restantes secções de tecido trabecular, este valor ainda assim é mais elevado do que os valores obtidos para as amostras de osso trabecular do osso saudável. Verifica-se nas últimas três secções um decréscimo na concentração de cálcio, fósforo e da razão Ca/P, apresentando a última secção de osso uma razão Ca/P semelhante à obtida para o osso saudável. Estes resultados parecem dar indicação sobre a extensão da doença no osso. E isto reflete uma das características da DOP, dado que esta é uma doença focal que acomete apenas um osso.

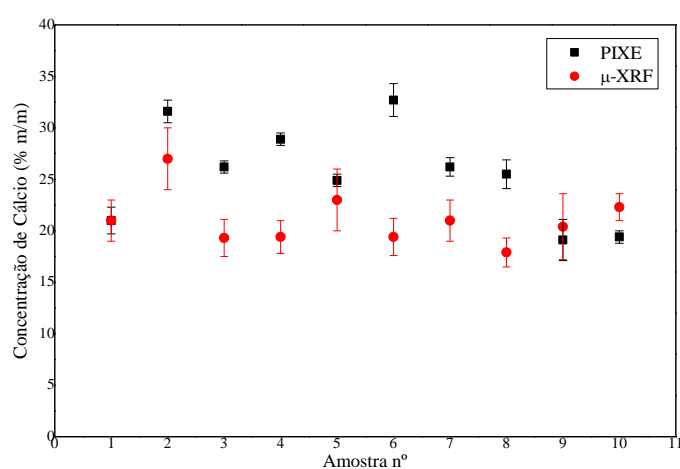


Figura 61) Gráfico da concentração de cálcio (%m/m) obtida para cada uma das secções de osso com DOP, por cada uma das técnicas.

Contrariamente ao verificado para o cálcio, no caso do fósforo os valores das concentrações obtidos por PIGE são inferiores aos obtidos por  $\mu$ -XRF sem filtros. A análise de secções de osso, nomeadamente de osso trabecular, caracterizado pela presença de buracos, pode induzir alterações nas medidas de  $\mu$ -XRF, pois atendendo a que os raios-X atravessam toda a amostra, estamos na realidade a fazer a análise de um volume, como já foi referido. Em contrapartida, a análise por PIGE é essencialmente uma análise superficial, dado que os raios-X penetram cerca de 100  $\mu$ m no tecido ósseo.

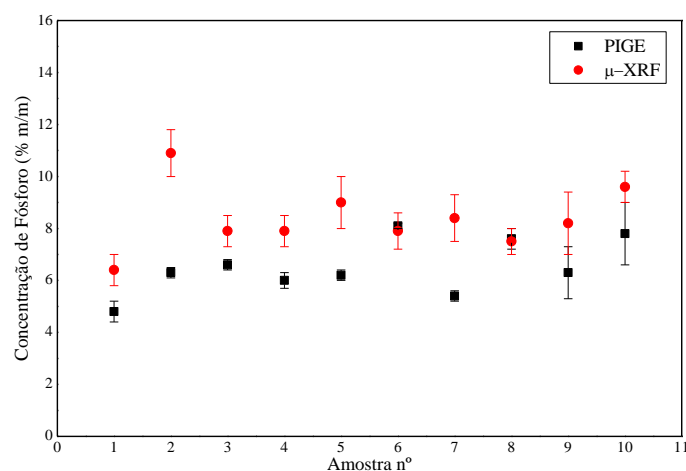


Figura 62) Gráfico da concentração de fósforo (%m/m) obtida para cada uma das secções de osso com DOP, por cada uma das técnicas.

Como é possível verificar pela análise do gráfico da figura 63, a concentração de zinco obtida por PIXE é superior, para todas as secções de osso, às concentrações de zinco obtidas por μ-XRF. Os resultados de PIXE mostram que para a primeira e última secções a concentração de zinco é ligeiramente inferior às restantes. Maiores concentrações de zinco no osso estão relacionadas com áreas de formação ativa, e isto parece explicar as elevadas concentrações de zinco no osso pagético, dado que esta patologia é caracterizada por formação excessiva de osso anómalo por resposta à reabsorção descontrolada desencadeada por osteoclastos hipernucleados. Este resultado também pode estar relacionado com a incorporação de elementos metálicos como resultado de uma exposição ambiental, o que poderá justificar também a acumulação de chumbo no osso. Por exemplo, no Alentejo, onde a doença é mais incidente existem minas de extração de cobre e de zinco e minas de extração de mármore, estas últimas em Estremoz, onde são verificados mais casos clínicos da doença. Não existem na literatura resultados de um estudo elementar em osso com DOP, pelo que é apenas possível comparar os resultados obtidos com o osso saudável e tentar identificar as diferenças. Dado que a DOP é uma doença que surge apenas em algumas regiões de um dado País, que é registada sobretudo em zonas rurais, e que se verificou um decréscimo na incidência e na severidade da doença, o que pode coincidir por exemplo com o encerramento de minas, a hipótese de exposição ambiental tem sido sugerida como um possível promotor (*trigger*) da doença. No caso do osso com DOP, como referido, foram encontradas elevadas concentrações de chumbo. Recentemente foram publicados os resultados de análises de amostras de osso de fémur com DOP provenientes de banco de ossos, nos quais foram encontradas concentrações de chumbo

muito elevadas, na ordem de 18-43.5  $\mu\text{g/g}$  [90]. Para ser possível fazer uma associação entre a presença deste elemento e a etiologia da doença, é necessário analisar mais amostras. No entanto, o número de pacientes com DOP que são submetidos a cirurgia é muito reduzido, o que faz com que seja muito difícil conseguir amostras para análise.

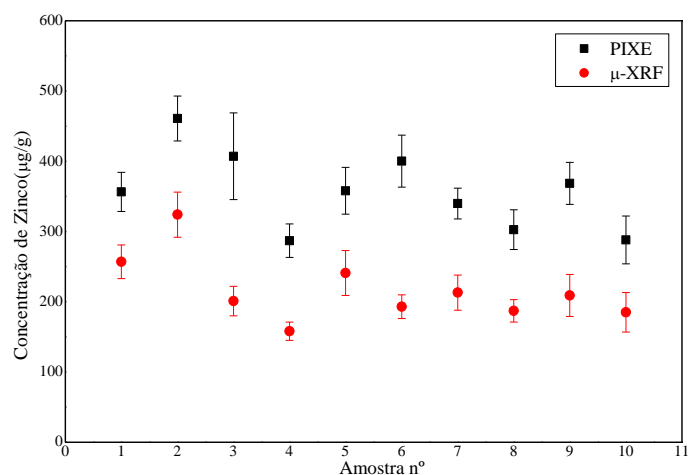


Figura 63) Gráfico da concentração de zinco ( $\mu\text{g/g}$ ) obtida para cada uma das secções de osso com DOP, por cada uma das técnicas.

Relativamente ao estrôncio os resultados obtidos são concordantes para ambas as técnicas, como é possível verificar no gráfico da figura 64. Os valores são superiores por comparação com os obtidos para o osso saudável.

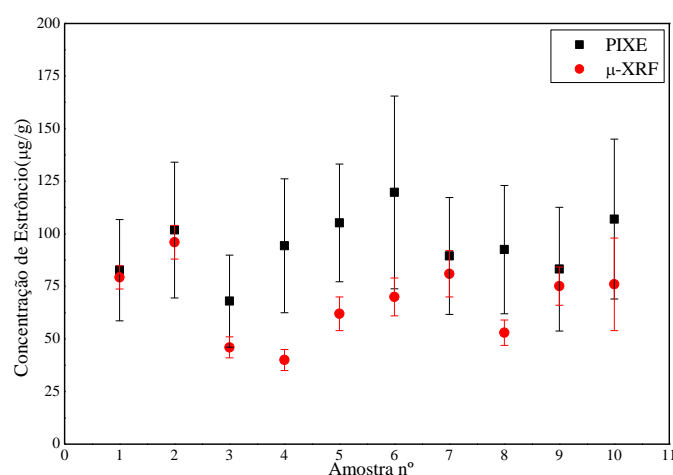


Figura 64) Gráfico da concentração de estrôncio obtida para cada uma das secções de osso com DOP, por cada uma das técnicas.

O gráfico da figura 65 mostra os valores da razão Ca/P obtidos por cada uma das técnicas, para todas as secções de osso. Tal como já foi concluído aquando da análise do cálcio, parece haver um decréscimo da razão Ca/P a partir da secção número 8. Comparando com os valores da razão Ca/P obtidas para o osso saudável (tabelas 16, 17 e 18) verifica-se que os valores da razão Ca/P para o osso afetado com DOP são mais elevados.

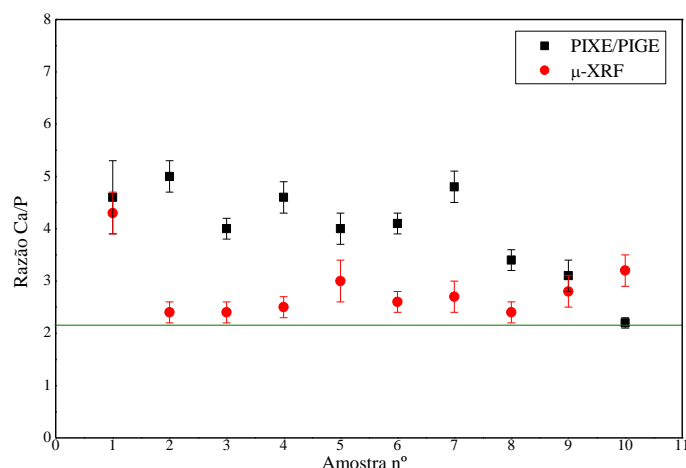


Figura 65) Razão Ca/P obtida por cada uma das técnicas para todas as secções do osso com DOP. A verde está representado o valor teórico da razão Ca/P para osso saudável, obtido a partir da fórmula da hidroxiapatite. A incerteza associada ao valor da razão Ca/P em cada análise é determinado a partir das incertezas associadas ao valor da concentração do cálcio e do fósforo. Os valores apresentados para cada secção correspondem à média das análises feitas em cada secção e a incerteza traduz a dispersão dos valores das análises.

Algumas amostras foram analisadas por PIXE e PIGE para diferentes energias do feixe incidente, 2611 keV e 3480 keV. Os resultados encontram-se no Anexo 4. A secção número 10 foi também analisada por μ-PIXE na microsonda nuclear. As análises foram realizadas com um feixe de prótons com 1000 keV. A carga foi determinada com rigor por ajuste dos espectros de μ-EBS coletados simultaneamente, com recurso ao programa WiNDF. As condições de análise foram descritas em detalhe anteriormente. Na tabela 23 encontram-se registadas as concentrações obtidas para os vários elementos.



<b>Concentração (%m/m)</b>	Ca	16.4	±	1.9
	P	8.6	±	1.1
	Na	0.61		0.05
	Mg	0.29		0.04
	Ca/P	1.9	±	0.5
<b>Concentração (µg/g)</b>	Cl	537	±	85
	S	1655	±	255
	Na	6092	±	493
	Mg	2849	±	376

Tabela 23) Resultados da análise da secção número 10 por  $\mu$ -PIXE na microsonda nuclear no LATR-CTN/IST. As concentrações apresentadas correspondem ao valor médio das análises efetuadas em diferentes áreas da secção sendo as incertezas calculadas com base na dispersão dos resultados.

Também foi possível quantificar o sódio para esta amostra por PIGE, para a reação de dispersão inelástica  $^{23}\text{Na}(p,p'\gamma)\text{Na}^{23}$ , ( $E_\gamma = 440 \text{ keV}$ ), com o resultado de  $0.47 \pm 0.03$  em %m/m. Obteve-se também o valor da concentração de flúor,  $0.63 \pm 0.03$  em % m/m, a partir do rendimento gama para a reação  $^{19}\text{F}(p,p'\gamma)\text{F}^{19}$  ( $\gamma = 197 \text{ keV}$ ). A análise a 3480 keV permitiu quantificar o magnésio, a partir da radiação gama de 584 keV correspondente à reação de dispersão inelástica  $^{25}\text{Mg}(p,p'\gamma)\text{Mg}^{25}$ , com o resultado de  $0.27 \pm 0.03$  em % m/m. Os valores obtidos por PIGE e por  $\mu$ -PIXE são concordantes e o desvio verificado pode dever-se ao facto de a análise por  $\mu$ -PIXE ser focada numa área pequena enquanto que a análise PIGE é feita numa área comparativamente maior.

### C. Osteoporose

As tabelas 24 e 25 mostram os valores obtidos para as concentrações de cálcio por PIXE e por  $\mu$ -XRF, sem filtros, para quatro amostras de osso osteoporótico de pacientes com idades compreendidas entre os 75 e os 85 anos. Os ossos osteoporóticos 1 e 4 apresentam quantidades bastante reduzidas de cálcio por comparação com o osso saudável. Estes valores estão de acordo com resultados publicados na literatura, para fraturas osteoporóticas, com valor médio 1.87 %m/m para a cartilagem e 9.77 % m/m para osso trabecular [8] e  $10.4 \pm 3.5$  %m/m (valor mínimo e máximo, 4.8 e 21 % m/m, respetivamente) [3]. Os resultados apresentados nas tabelas 24 e 25 correspondem aos valores médios das análises efetuadas em diferentes áreas da mesma

amostra e as incertezas são calculadas com base na dispersão dos valores. As células sombreadas da tabela indicam amostras que não foram analisadas. Nos ossos osteoporóticos 1 e 3 a secção número 1 não existia. A secção número 8 do osso osteoporótico 1 e a secção número 6 do osso osteoporótico 4 eram demasiado finas e o feixe atravessava a amostra devido à porosidade da mesma. No osso osteoporótico 2 as secções números 5, 6, 7, 8 e 10 foram usadas numa tentativa de fazer uma pastilha. No osso osteoporótico 3 e 4, não existem as secções números 9 e 10. O número de amostras depende do tamanho da peça óssea removida durante a cirurgia.

Concentração de Cálcio (%m/m)												
	Osteoporótico 1			Osteoporótico 2			Osteoporótico 3			Osteoporótico 4		
<b>1</b>				1.0	±	0.4				0.9	±	0.4
<b>2</b>	6.1	±	1.3	13.0	±	0.4	32.5	±	1.2	11.8	±	1.7
<b>3</b>	5.9	±	0.4	24.8	±	1.5	33.0	±	1.2	9.0	±	1.0
<b>4</b>	16.5	±	0.8	17.0	±	1.0	23.3	±	1.1	8.5	±	0.6
<b>5</b>	7.0	±	0.7				25.1	±	1.1	17.7	±	1.0
<b>6</b>	6.1	±	1.6				30.0	±	1.8			
<b>7</b>	9.4	±	2.0				28.4	±	1.9	8.0	±	2.0
<b>8</b>							20.8	±	1.5	5.6	±	0.4
<b>9</b>	14.9	±	1.6	21.6	±	2.3						
<b>10</b>	20.7	±	0.9									

Tabela 24) Concentração de cálcio (% m/m) obtida para quatro ossos osteoporóticos por PIXE na câmara de reações nucleares do LATR-CTN/IST. As células sombreadas da tabela indicam amostras que não foram analisadas (ver texto).

Concentração de Cálcio (%m/m)												
	Osteoporótico 1			Osteoporótico 2			Osteoporótico 3			Osteoporótico 4		
<b>1</b>				24.4	±	3.5						
<b>2</b>	17.8	±	4.5	19.1	±	3.1	26.1	±	2.4	20.3	±	5.2
<b>3</b>	13.5	±	3.1	21.6	±	2.0	25.4	±	2.3	21.1	±	5.4
<b>4</b>	18.4	±	1.2	19.5	±	2.0	25.1	±	2.8	17.4	±	1.3
<b>5</b>	18.0	±	2.6	20.9	±	1.9	23.6	±	3.2	22.2	±	3.4
<b>6</b>	24.2	±	6.0	21.5	±	2.9	27.1	±	1.5	19.6	±	2.3
<b>7</b>	17.4	±	2.1	19.5	±	2.2	19.6	±	4.0	22.0	±	4.8
<b>8</b>	28.3	±	6.1	21.2	±	3.2	28.9	±	1.6	23.1	±	4.9
<b>9</b>	22.2	±	1.9	23.1	±	1.4						
<b>10</b>	22.6	±	1.9									

Tabela 25) Valores da concentração de cálcio (% m/m) obtidos para quatro ossos osteoporóticos por  $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker na FCT/UNL.

Os gráficos da figura 66 permitem comparar os resultados obtidos para cálcio com as diferentes técnicas. Mais uma vez os resultados de PIXE estão em geral abaixo dos resultados obtidos por  $\mu$ -XRF provavelmente pelas razões já referidas anteriormente.

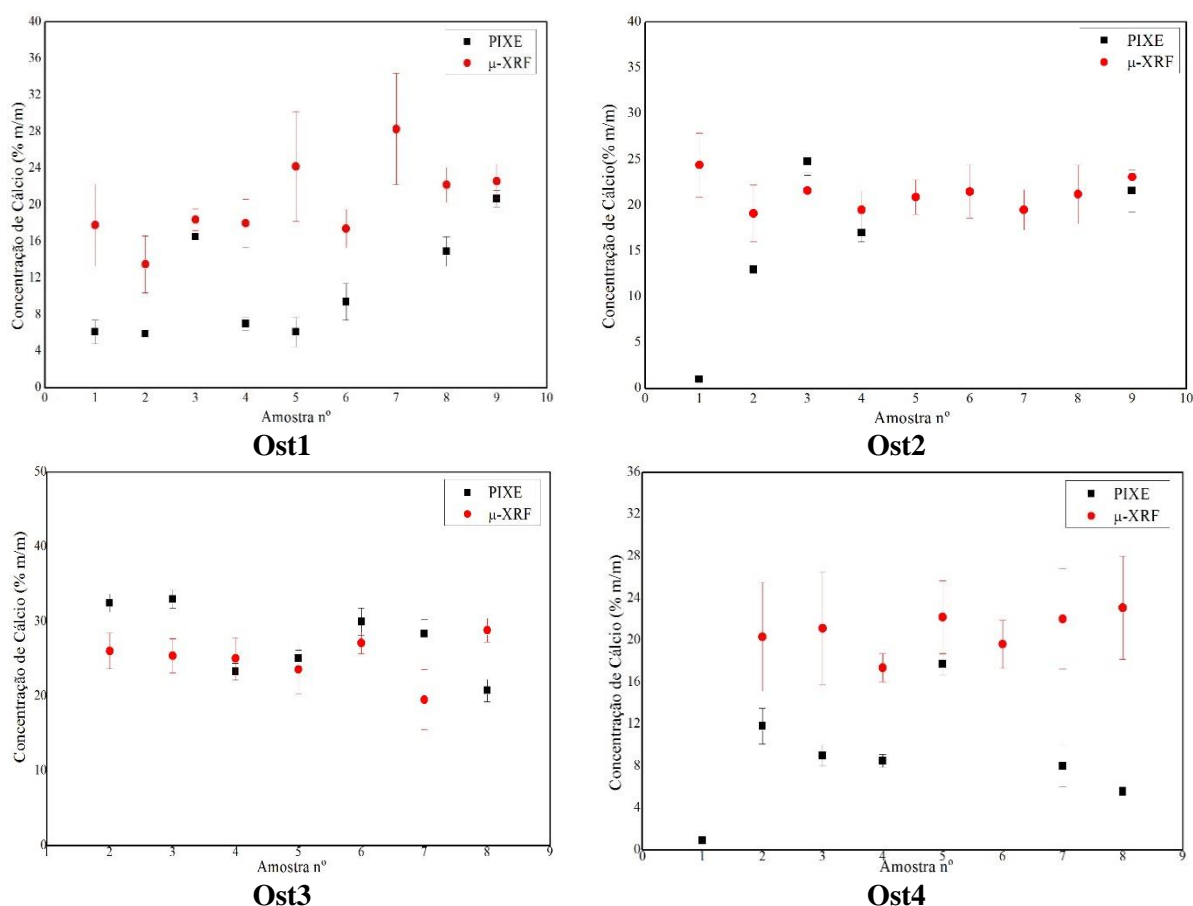


Figura 66) Gráficos das concentrações de cálcio (% m/m) obtidas por PIXE e por  $\mu$ -XRF para os quatro ossos osteoporóticos.

As tabelas 26 e 27 mostram os resultados obtidos para as concentrações de fósforo por PIXE e por  $\mu$ -XRF. Um dos valores encontrados na literatura para osteoporose, para cabeça do fémur, é de 0.94 % m/m para tecido da cartilagem e de 4.99 % m/m para tecido esponjoso [8].

Concentração de Fósforo (%m/m)												
	Osteoporótico 1			Osteoporótico 2			Osteoporótico 3			Osteoporótico 4		
1				0.7	±	0.2				0.6	±	0.3
2	0.9	±	0.2	7.1	±	0.6	7.6	±	0.1	3.8	±	0.6
3	1.7	±	0.1	8.4	±	0.6	8.2	±	1.2	2.8	±	0.4
4	6.0	±	0.3	6.2	±	0.3	6.9	±	0.3	3.1	±	0.4
5	2.7	±	0.3				7.5	±	0.3	5.3	±	0.6
6	2.4	±	0.6				8.2	±	0.4			
7	6.7	±	1.6				5.8	±	1.0			
8							10.6	±	0.9	6.4	±	0.1
9	8.4	±	0.3	6.6	±	0.6						
10	6.1	±	0.2									

Tabela 26) Valores da concentração de fósforo em %m/m obtidos para quatro ossos osteoporóticos por PIGE na câmara de reações nucleares do LATR-CTN/IST.

Concentração de Fósforo (%m/m)												
	Osteoporótico 1			Osteoporótico 2			Osteoporótico 3			Osteoporótico 4		
1				10.7	±	1.6						
2	7.0	±	1.7	8.8	±	1.4	11.2	±	0.6	8.4	±	2.0
3	5.1	±	1	9.3	±	1.1	10.8	±	0.6	5.4	±	1.4
4	7.2	±	0.9	8.5	±	0.7	10.0	±	0.8	7.0	±	1.0
5	5.1	±	0.8	9.3	±	0.8	9.0	±	0.8	8.2	±	1.2
6	10.9	±	2.6	9.9	±	1.5	10.7	±	0.3	7.3	±	1.1
7	6.8	±	1.3	7.9	±	0.8	5.9	±	1.0	7.8	±	1.6
8	10.2	±	2.1	10.0	±	1.4	12.1	±	0.4	8.9	±	1.9
9	9.4	±	0.8	9.9	±	0.6						
10	8.9	±	0.9									

Tabela 27) Valores da concentração de fósforo em % m/m obtidos para quatro ossos osteoporóticos por  $\mu$ -XRF no espectrómetro M4 - Tornado da Bruker na FCT/UNL.

Os resultados das análises por PIGE da secção número 1 dos ossos osteoporóticos 2 e 4 mostram que as concentrações de fósforo são muito reduzidas por comparação com as restantes secções de osso trabecular. Os resultados para ambos os tecidos, cartilagem e esponjoso, são concordantes com os valores encontrados na literatura. Os resultados de  $\mu$ -XRF para as concentrações de fósforo são superiores aos valores obtidos por PIGE para quase todas as amostras (figura 67). A reta de calibração para quantificação nas análises por  $\mu$ -XRF é aferida com base na análise dos já referidos materiais de referência padrão. Ora, as concentrações de fósforo dos referidos materiais variam entre os 12.3 e 17.91  $\mu\text{g/g}$ . Acima e abaixo destes limites a reta é calculada por extrapolação. Dado que as concentrações de fósforo para o osso

osteoporótico são bastante inferiores, a quantificação terá sempre uma incerteza associada maior.

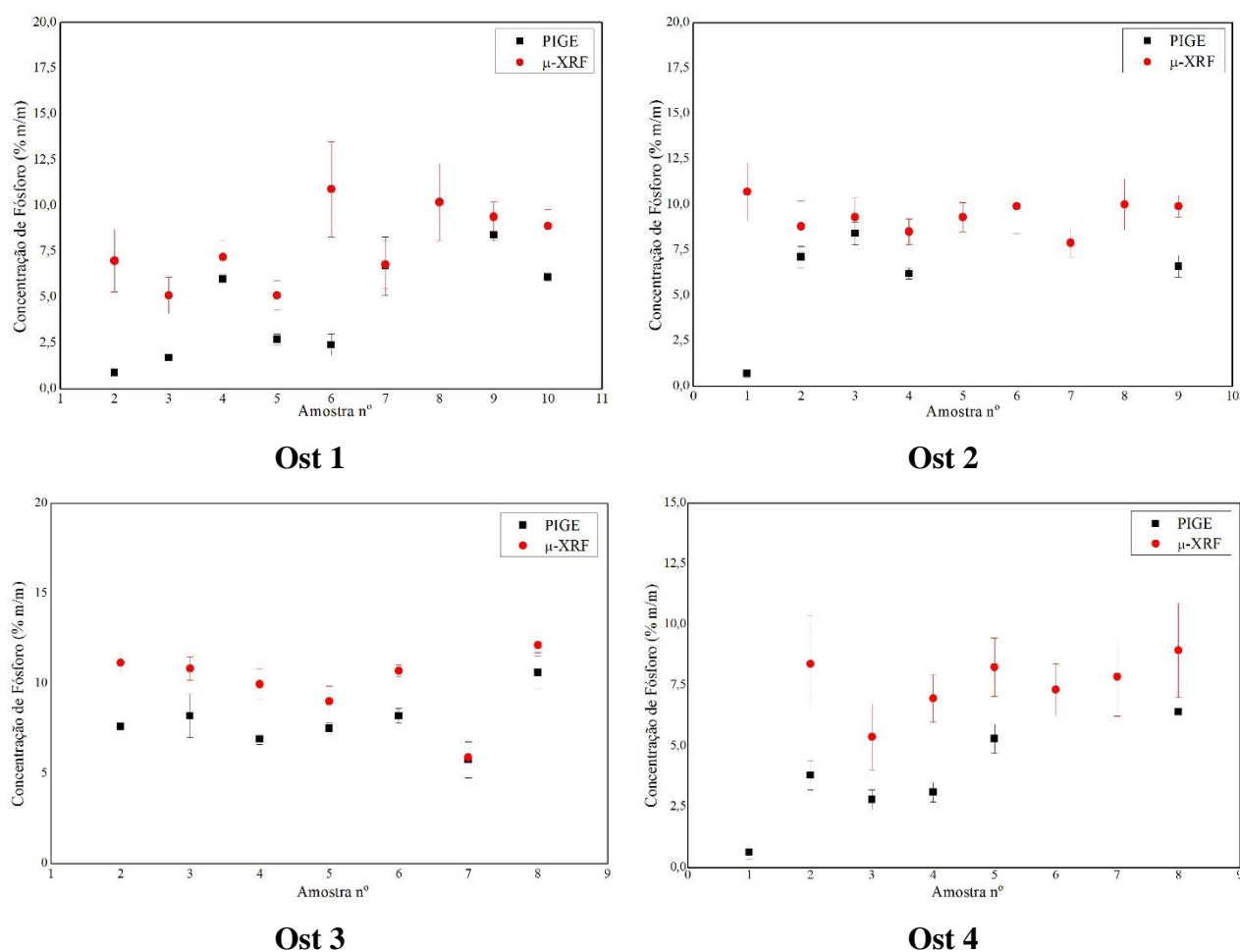


Figura 67) Gráficos das concentrações de fósforo (em %m/m) obtidas por PIGE e por μ-XRF para os quatro ossos osteoporóticos.

Os valores fornecidos na literatura para a concentração de zinco em ossos com osteoporose, para cabeça de fêmur e para tecido esponjoso, são variáveis, referindo-se os valores  $95 \pm 21 \mu\text{g/g}$  para fraturas osteoporóticas para osso trabecular [3], e o valor  $95 \mu\text{g/g}$  da referência [8]. Quanto à comparação dos resultados de PIXE com μ-XRF com exceção da amostra osteoporótica 3 em geral os resultados de μ-XRF são superiores aos obtidos por PIXE (figura 68). Verifica-se que os valores de zinco para o tecido da cartilagem são inferiores aos valores obtidos para o tecido trabecular o que segue a tendência dos elementos majoritários cálcio e fósforo. Verifica-se para todos os ossos osteoporóticos, à semelhança do encontrado para o osso saudável e para o osso com DOP, que existe uma grande variabilidade de zinco no

tecido ósseo. O osso osteoporótico 3 apresenta concentrações de zinco muito elevadas e tal pode dever-se ao uso de suplementos o que é comum em pessoas de idade avançada com sintomas de osteoporose. Os suplementos típicos têm na sua constituição para além de vitaminas, vários minerais como o cálcio, o fósforo e o magnésio, na ordem das centenas de mg, ferro, manganésio e zinco na ordem dos poucos mg e iodo, cobre, crómio, molibdénio e selénio na ordem dos microgramas. Aliás, na análise por PIXE da secção número 1 do osso osteoporótico 3 foi encontrado crómio com concentração  $148 \pm 16$   $\mu\text{g/g}$ . Na secção número 3, foi também encontrado manganésio,  $75 \pm 49$   $\mu\text{g/g}$  e níquel,  $181 \pm 63$   $\mu\text{g/g}$ . Na secção número 7 foi encontrado crómio com uma concentração  $139 \pm 38$   $\mu\text{g/g}$ .

Concentração de Zinco ( $\mu\text{g/g}$ )												
	Osteoporótico 1			Osteoporótico 2			Osteoporótico 3			Osteoporótico 4		
<b>1</b>				55.5	$\pm$	15.0				22.5	$\pm$	9.0
<b>2</b>	111.0	$\pm$	22.0	121.0	$\pm$	11.0	479.5	$\pm$	64.7	122.8	$\pm$	16.9
<b>3</b>	65.9	$\pm$	13.0	223.0	$\pm$	21.0	453.8	$\pm$	35.2	95.6	$\pm$	17.1
<b>4</b>	128.0	$\pm$	17.0	192.0	$\pm$	19.0	268.2	$\pm$	60.2	70.8	$\pm$	11.2
<b>5</b>	63.0	$\pm$	9.9				298.7	$\pm$	39.0	154.2	$\pm$	18.9
<b>6</b>	82.5	$\pm$	17.0				413.6	$\pm$	52.5			
<b>7</b>	60.5	$\pm$	15.0				512.2	$\pm$	41.1	87.1	$\pm$	18.1
<b>8</b>							242.2	$\pm$	39.9	57.5	$\pm$	11.5
<b>9</b>	113.0	$\pm$	19.0	257.0	$\pm$	31.0						
<b>10</b>	172.0	$\pm$	24.0									

Tabela 28) Concentração de zinco em  $\mu\text{g/g}$  obtidas para quatro ossos osteoporóticos por PIXE na câmara de reações nucleares do LATR-CTN/IST.

Concentração de Zinco ( $\mu\text{g/g}$ )												
	Osteoporótico 1			Osteoporótico 2			Osteoporótico 3			Osteoporótico 4		
<b>1</b>				171	$\pm$	18						
<b>2</b>	177	$\pm$	34	135	$\pm$	15	184	$\pm$	20	174	$\pm$	26
<b>3</b>	142	$\pm$	21	182	$\pm$	26	148	$\pm$	23	192	$\pm$	33
<b>4</b>	160	$\pm$	28	181	$\pm$	20	184	$\pm$	29	216	$\pm$	33
<b>5</b>	153	$\pm$	26	161	$\pm$	22	156	$\pm$	13	149	$\pm$	24
<b>6</b>	164	$\pm$	28	185	$\pm$	19	170	$\pm$	22	126	$\pm$	17
<b>7</b>	131	$\pm$	15	145	$\pm$	13	159	$\pm$	26	151	$\pm$	31
<b>8</b>	119	$\pm$	11	169	$\pm$	18	183	$\pm$	23	128	$\pm$	19
<b>9</b>	159	$\pm$	32	160	$\pm$	40						
<b>10</b>	131	$\pm$	27									

Tabela 29) Concentração de zinco em  $\mu\text{g/g}$  obtidas para quatro ossos osteoporóticos por  $\mu\text{-XRF}$  no espectrómetro M4 - Tornado da Bruker na FCT/UNL.

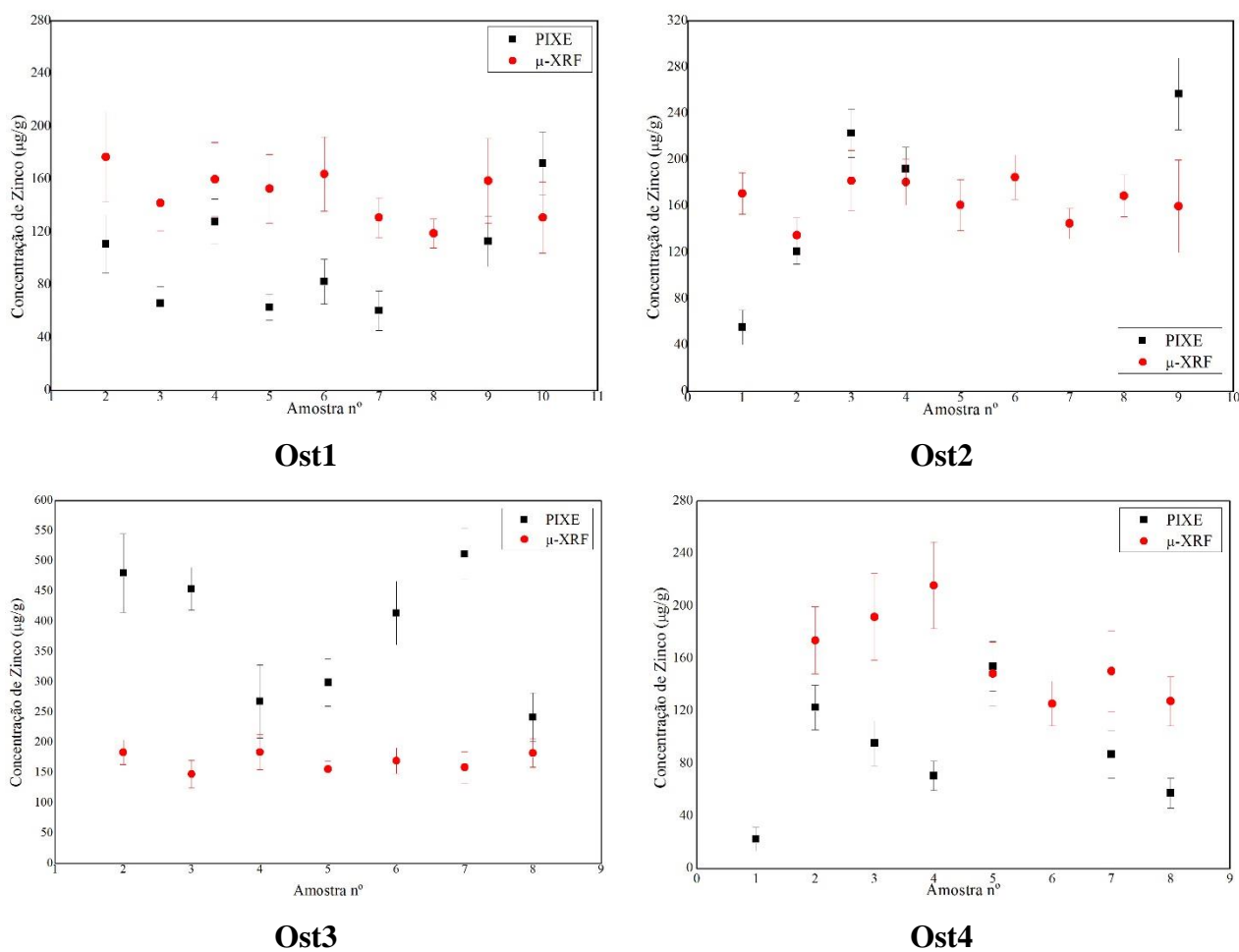


Figura 68) Gráficos das concentrações de zinco ( $\mu\text{g/g}$ ) obtidas por PIXE e por  $\mu\text{-XRF}$  para quatro ossos osteoporóticos.

As tabelas 30 e 31 contêm os valores de estrôncio obtidos para os quatro ossos osteoporóticos, por PIXE e por  $\mu\text{-XRF}$ . Devido aos baixos limites de detecção para elementos de elevado Z, no PIXE foi apenas possível quantificar o estrôncio para algumas secções.

Concentração de Estrôncio (µg/g)												
	Osteoporótico 1			Osteoporótico 2			Osteoporótico 3			Osteoporótico 4		
1												
2	22.7	±	12.3	27.1	±	16.8	137.8	±	41.9	25.9	±	16.6
3	-	-	-	57.4	±	22.4	82.5	±	31.0	32.5	±	18.1
4	-	-	-	60.8	±	22.5	64.1	±	24.9	-	-	-
5	-	-	-				76.7	±	29.5	64.4	±	29.7
6	-	-	-				111.6	±	32.2			
7	-	-	-				71.2	±	36.3	-	-	-
8							71.3	±	31.5	-	-	-
9	36.8	±	26.8	64.1	±	27.9						
10	38.1	±	27.0									

Tabela 30) Concentração de estrôncio em  $\mu\text{g/g}$  obtidas para quatro ossos osteoporóticos por PIXE na câmara de reações nucleares do LATR-CTN/IST.

Concentração de Estrôncio (µg/g)												
	Osteoporótico 1			Osteoporótico 2			Osteoporótico 3			Osteoporótico 4		
1				58.3	±	8.7						
2	29.1	±	5.9	40.2	±	5.1	66.8	±	5.8	36.3	±	4.3
3	25.8	±	3.9	48.6	±	5.0	23.3	±	3.4	75.2	±	23.1
4	29.8	±	5.8	48.4	±	5.5	65.7	±	10.4	59.9	±	8.4
5	32.0	±	4.3	47.7	±	7.1	63.4	±	11.1	50.4	±	12.2
6	44.9	±	6.3	59.2	±	5.7	63.7	±	6.5	38.6	±	9.6
7	35.3	±	4.5	48.0	±	6.7	51.8	±	9.1	101.4	±	19.8
8	30.5	±	4.4	52.2	±	6.5	65.4	±	9.2	65.3	±	11.8
9	40.8	±	7.7	61.4	±	27.7						
10	35.5	±	9.3									

Tabela 31) Concentração de estrôncio em  $\mu\text{g/g}$  obtidas para quatro ossos osteoporóticos por  $\mu$ -PIXE no espectrômetro M4 - Tornado da Bruker na FCT/UNL.

Um dos valores encontrados na literatura para a concentração de estrôncio em osso trabecular foi  $42 \pm 19 \mu\text{g/g}$  [5]. Com exceção do osso osteoporótico 3, para todas as outras amostras os valores estão de acordo com o valor encontrado na literatura. Como é possível verificar pelos gráficos da figura 69, os valores de estrôncio são constantes quando se analisam diferentes áreas do tecido ósseo. Como referido, os baixos limites de deteção do detetor de



raios-X no caso das análises PIXE, faz com que as incertezas associadas às medidas sejam muito elevadas. Para o estrôncio e dada a elevada incerteza dos resultados de PIXE pode concluir-se que há acordo com os de  $\mu$ -XRF.

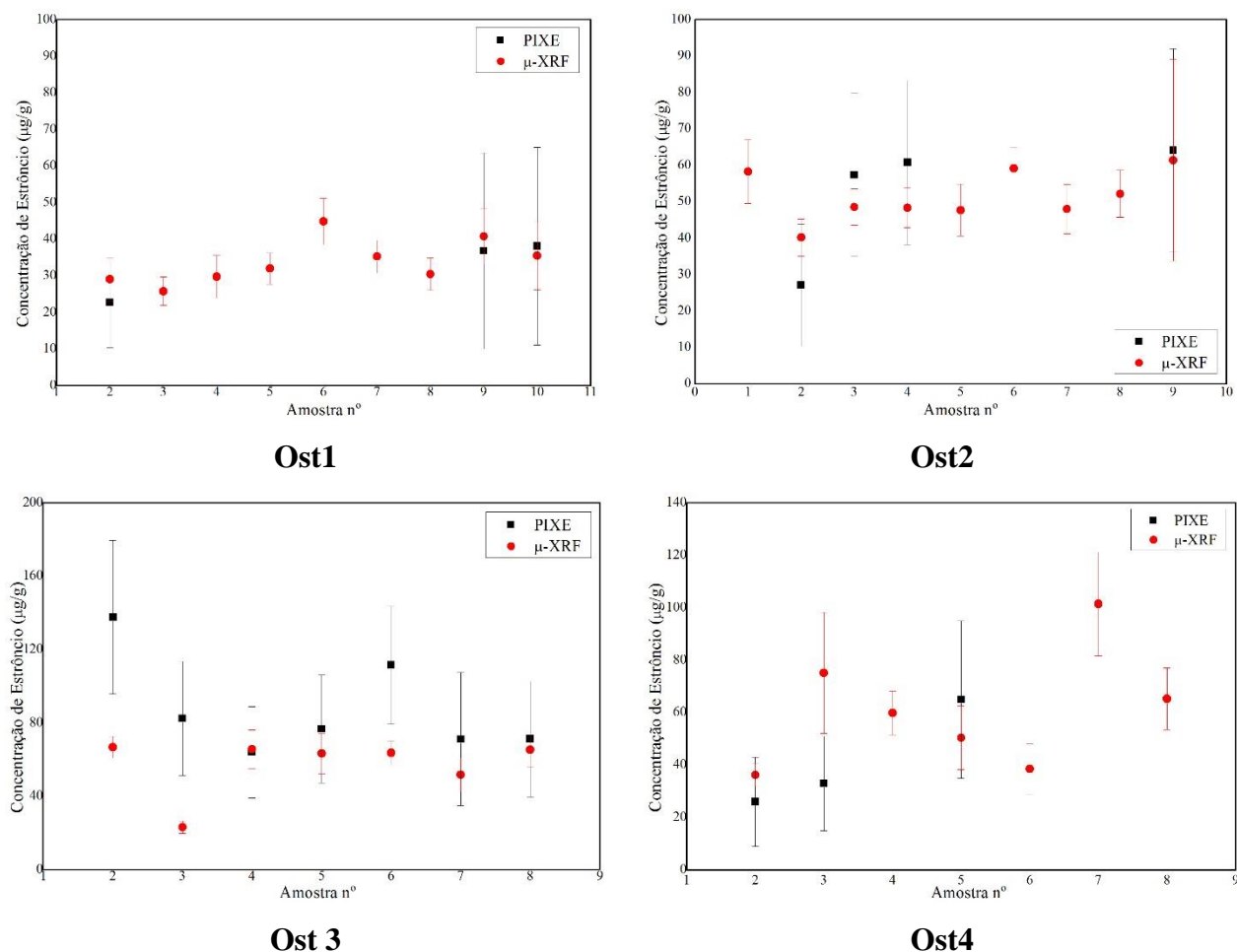


Figura 69) Gráficos das concentrações de estrôncio ( $\mu\text{g/g}$ ) obtidas por PIXE e por  $\mu$ -XRF para os quatro ossos osteoporóticos.

Os valores obtidos para a razão Ca/P para osso osteoporótico encontram-se nas tabelas 32 e 33. Como é possível verificar, existe uma grande variabilidade da razão Ca/P ao longo do tecido ósseo o que sugere uma degradação não homogênea da matriz da hidroxiapatite. De um modo geral os valores são mais elevados do que os obtidos para o osso saudável, com exceção do tecido da cartilagem em que se registam valores bastante inferiores, o que significa que há uma perda preferencial de cálcio neste tecido. Na secção número 7 do osso osteoporótico 4 registou-se uma razão Ca/P bastante superior à obtida para as restantes secções do mesmo osso. Este resultado deve-se essencialmente às reduzidas concentrações de fósforo obtidas para esta

amostra. Os valores apresentados para cada amostra correspondem à média das análises feitas em cada amostra e a incerteza traduz a dispersão dos valores das análises.

Razão Ca/P												
	Osteoporótico 1			Osteoporótico 2			Osteoporótico 3			Osteoporótico 4		
<b>1</b>				1.3	±	0.2				1.4	±	0.2
<b>2</b>	6.1	±	0.9	1.9	±	0.2	4.3	±	0.2	3.1	±	0.3
<b>3</b>	3.3	±	0.4	3.0	±	0.3	4.2	±	0.5	3.3	±	0.3
<b>4</b>	2.7	±	0.2	2.8	±	0.2	3.3	±	0.3	2.9	±	0.3
<b>5</b>	2.6	±	0.2				3.4	±	0.3	3.4	±	0.4
<b>6</b>	2.5	±	0.2				3.7	±	0.1			
<b>7</b>	1.4	±	0.1				5.0	±	0.5	7.1	±	1.4
<b>8</b>							2.0	±	0.1	0.9	±	0.1
<b>9</b>	1.8	±	0.2	3.3	±	0.2						
<b>10</b>	3.4	±	0.2									

Tabela 32) Valores da razão Ca/P obtidas para quatro ossos osteoporóticos por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do LATR-CTN/IST.

Razão Ca/P												
	Osteoporótico 1			Osteoporótico 2			Osteoporótico 3			Osteoporótico 4		
<b>1</b>				2.7	±	0.2						
<b>2</b>	3.2	±	0.6	2.0	±	0.1	2.3	±	0.1	2.1	±	0.3
<b>3</b>	2.5	±	0.4	2.5	±	0.2	2.3	±	0.2	2.8	±	0.5
<b>4</b>	3.1	±	0.4	2.3	±	0.2	2.5	±	0.2	3.0	±	0.4
<b>5</b>	3.4	±	0.3	2.3	±	0.1	2.6	±	0.2	2.7	±	0.2
<b>6</b>	2.5	±	0.2	2.7	±	0.3	2.5	±	0.1	2.9	±	0.2
<b>7</b>	4.1	±	0.6	2.5	±	0.2	3.1	±	0.3	3.3	±	0.5
<b>8</b>	2.5	±	0.2	2.3	±	0.2	2.4	±	0.1	3.2	±	0.7
<b>9</b>	2.5	±	0.1	2.5	±	0.1						
<b>10</b>	2.7	±	0.3									

Tabela 33) Valores da razão Ca/P obtidas para quatro ossos osteoporóticos por  $\mu$ -XRF no espectrómetro M4 - Tornado da Bruker na FCT/UNL.

Os gráficos da figura 70 permitem comparar os resultados obtidos para a razão Ca/P para as quatro amostras de osso osteoporótico por PIXE/PIGE e por  $\mu$ -XRF. Para a maioria das amostras os valores para ambas as técnicas não são concordantes.

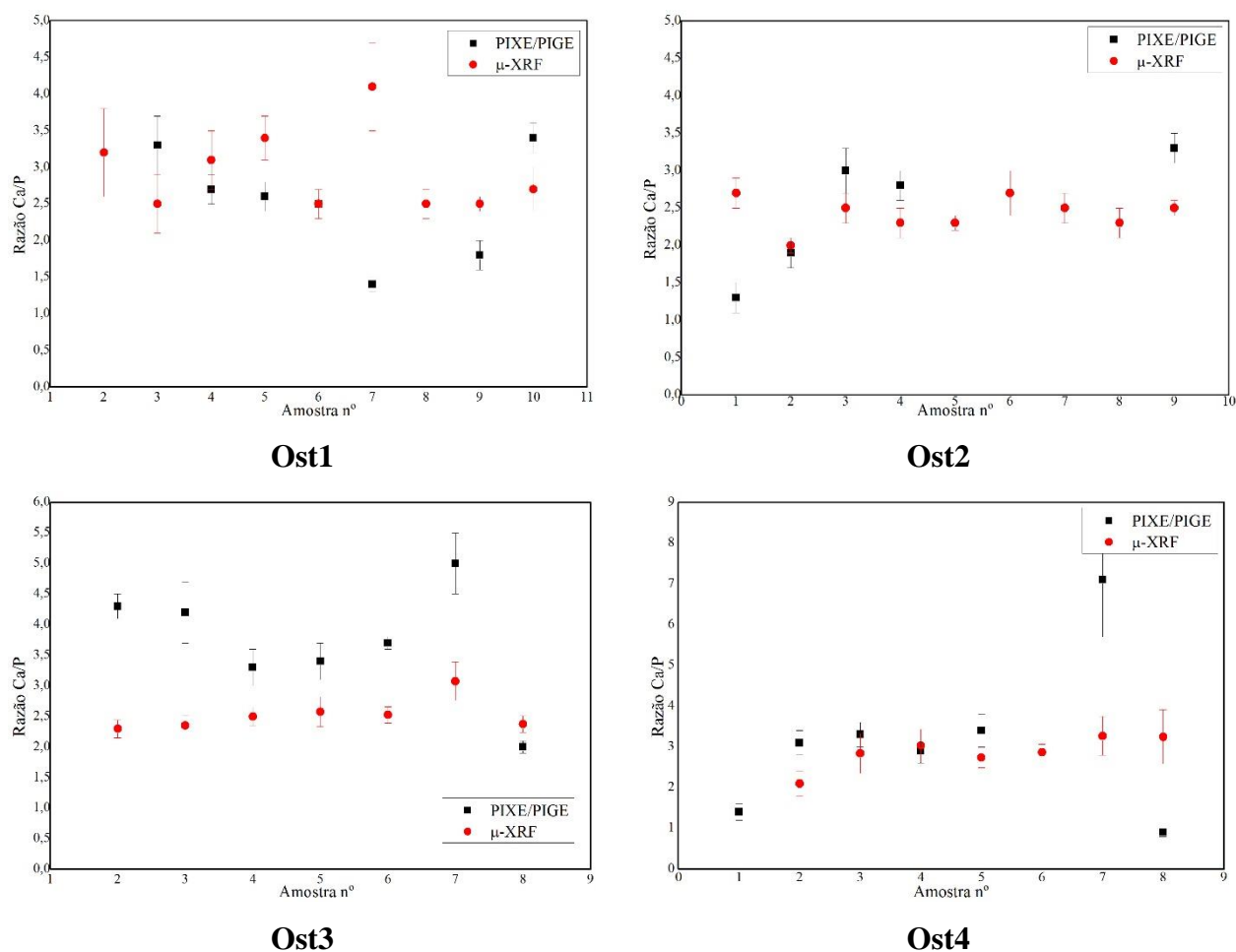


Figura 70) Gráficos da razão Ca/P obtidas por PIXE/PIGE e por  $\mu$ -XRF para os quatro ossos osteoporóticos.

Por  $\mu$ -XRF foi também possível quantificar o potássio e o chumbo nas amostras ósseas. Nas tabelas 34 e 35 encontram-se os resultados obtidos para estes elementos. O potássio é um elemento essencial intimamente ligado ao metabolismo do cálcio e do fósforo. Estudos efetuados indicam que maiores doses de potássio aumentam a absorção e reduzem o cálcio na urina. Uma deficiência de potássio pode provocar várias anormalidades ósseas, incluindo retardação do crescimento e osteopénia e debilitado metabolismo do osso e da cartilagem [170], [171].

Concentração de Potássio (µg/g)												
	Osteoporótico 1			Osteoporótico 2			Osteoporótico 3			Osteoporótico 4		
<b>1</b>				173	±	22						
<b>2</b>	133	±	45	131	±	26	199	±	34	152	±	39
<b>3</b>	106	±	28	148	±	22	161	±	29	180	±	50
<b>4</b>	133	±	19	130	±	18	168	±	29	98	±	15
<b>5</b>	181	±	28	135	±	20	176	±	32	143	±	33
<b>6</b>	218	±	44	153	±	28	189	±	25	112	±	23
<b>7</b>	170	±	25	127	±	24	182	±	45	171	±	47
<b>8</b>	202	±	47	151	±	28	258	±	44	220	±	53
<b>9</b>	160	±	23	153	±	14						
<b>10</b>	190	±	27									

Tabela 34) Valores da concentração de potássio (µg/g) para quatro ossos osteoporóticos por µ-XRF no espectrómetro M4 - Tornado da Bruker na FCT/UNL.

Não se verificam diferenças significativas quando se comparam as concentrações de potássio obtidas para o osso saudável e para os ossos com patologia (tabelas 17, 21 e 34). Os valores são bastante inferiores aos encontrados na literatura [3, 172]

Concentração de Chumbo (µg/g)												
	Osteoporótico 1			Osteoporótico 2			Osteoporótico 3			Osteoporótico 4		
<b>1</b>				11.0	±	2.0						
<b>2</b>	9.0	±	2.0	11.0	±	2.0	-	-	-	38.0	±	7.0
<b>3</b>	8.0	±	2.0	18.0	±	4.0	-	-	-	8.0	±	2.0
<b>4</b>	7.0	±	3.0	14.0	±	2.0	-	-	-	8.0	±	2.0
<b>5</b>	8.0	±	1.0	13.0	±	3.0	-	-	-	< 5.0		
<b>6</b>	8.0	±	2.0	19.0	±	3.0	-	-	-	< 5.0		
<b>7</b>	9.0	±	2.0	14.0	±	2.0	-	-	-	< 5.0		
<b>8</b>	9.0	±	2.0	15.0	±	2.0	-	-	-	< 5.0		
<b>9</b>	8.0	±	2.0	15.0	±	2.0						
<b>10</b>	9.0	±	3.0									

Tabela 35) Valores da concentração de chumbo (µg/g) para quatro ossos osteoporóticos por µ-XRF no espectrómetro M4 - Tornado da Bruker na FCT/UNL.

As concentrações de chumbo registadas para osso osteoporótico são de um modo geral inferiores às concentrações obtidas para as amostras de tecido trabecular pagético. No osso osteoporótico 3 as concentrações obtidas estavam sempre abaixo do limite de deteção da técnica para este elemento. No osso osteoporótico 4 obteve-se uma concentração mais elevada para a secção número 2. Este resultado pode dever-se a uma contaminação da amostra durante a sua

preparação, dado que as restantes amostras deste osso apresentam concentrações bastante reduzidas deste elemento.

A amostra 2 do osso osteoporótico 2 foi analisada na microsonda nuclear usando um feixe focado de prótons produzido pelo acelerador Van de Graff com energia de 2000 keV. As condições experimentais de análise na microsonda nuclear foram descritas em pormenor anteriormente.

<b>Concentração (%m/m)</b>	Ca	14.0	±	0.1
	P	10.3	±	0.2
	Ca/P	1.4	±	0.1
<b>Concentração (µg/g)</b>	Zn	150	±	7
	Cl	504	±	19
	S	1867	±	69
	Fe	111	±	4

Tabela 36) Resultados da análise da secção número 2 do osso osteoporótico 2 por  $\mu$ -PIXE na microsonda nuclear no LATR-CTN/IST. As concentrações apresentadas correspondem ao valor médio das análises efetuadas em diferentes áreas da secção sendo as incertezas calculadas com base na dispersão dos dados.

As diferenças registadas, relativamente aos valores de PIXE/PIGE podem dever-se à variabilidade da distribuição dos elementos no tecido ósseo. Procedeu-se também à análise de algumas amostras de cada osso por PIXE para uma energia mais elevada do feixe incidente, 3480 keV. No anexo 3 encontram-se os resultados da análise para esta energia e também para a energia de 2611 keV. Os valores obtidos a todas as energias do feixe incidente são concordantes para a maioria das amostras e para a maioria dos elementos (anexo 3).

Para esta amostra obteve-se a quantificação de sódio por PIGE, para a reação de dispersão inelástica  $^{23}\text{Na}(p,p'\gamma)\text{Na}^{23}$ , ( $E_\gamma = 440 \text{ keV}$ ), com o resultado de  $0.27 \pm 0.03$  em %m/m. Obteve-se também o valor da concentração de flúor,  $0.57 \pm 0.03$  em % m/m, a partir do rendimento gama para a reação  $^{19}\text{F}(p,p'\gamma)\text{F}^{19}$  ( $\gamma = 197 \text{ keV}$ ). A análise a 3480 keV permitiu quantificar o magnésio, a partir da radiação gama de 584 keV correspondente à reação de dispersão inelástica  $^{25}\text{Mg}(p,p'\gamma)\text{Mg}^{25}$ , com o resultado de  $0.20 \pm 0.01$  em % m/m.

# Discussão dos Resultados

---

## 1. Viabilidade das Técnicas

Com a aplicação das técnicas PIXE,  $\mu$ -PIXE, PIGE e  $\mu$ -XRF pretendia-se obter uma análise elementar de amostras de osso (elementos maioritários e elementos traço), bem como fazer o mapeamento desses elementos, com o objetivo de estabelecer distinções entre osso saudável e osso com patologia (osteoporose e doença óssea de Paget). Nomeadamente pretendia-se:

1. PIXE – análise de elementos do sódio ao chumbo, obtendo no caso do  $\mu$ -PIXE o mapeamento dos mesmos.
2. PIGE – quantificar o fósforo gozando do benefício de a radiação gama do fósforo não ser absorvida pela amostra e, portanto, não ser influenciada por efeitos geométricos.
3.  $\mu$ -XRF – beneficiando do fato de ser uma técnica mais rápida, obter mapeamento de elementos e uma quantificação mais sensível para elementos pesados.

Quanto ao PIXE, apesar das limitações do detetor (má resolução e detecção apenas acima do cálcio), obteve-se o que se pretendia. No entanto, para elementos pesados tais como o chumbo, não foi possível encontrar uma combinação de energia do feixe incidente versus filtros que permitisse melhorar a sensibilidade da detecção desses elementos. Apesar disso foi possível quantificar chumbo em algumas amostras com concentrações superiores a 50  $\mu\text{g/g}$ .

Para o PIGE a limitação para a quantificação de fósforo estava relacionada com a inexistência de uma seção eficaz da reação pertinente que permitisse a quantificação. Uma vez medida esta seção eficaz a quantificação do fósforo foi feita com sucesso. Adicionalmente foram vistos com esta técnica elementos como o flúor, o sódio e o magnésio o que permite no caso dos dois últimos fazer uma comparação com resultados obtidos por  $\mu$ -PIXE.

Tanto para PIXE como para PIGE foi possível atingir um dos objetivos pretendidos que era distinguir os valores de razão Ca/P e da concentração dos elementos maioritários e traço em diferentes tipos de osso.

Para  $\mu$ -XRF os já referidos efeitos geométricos conduziram a uma dispersão muito grande dos valores obtidos nas diferentes áreas analisadas em cada amostra, com consequente elevada

incerteza nos valores de concentração, o que não permitiu a distinção entre diferentes tipos de osso. A diferença de valores registada relativamente aos resultados de PIXE/PIGE pode dever-se também ao método de quantificação que é feito por comparação com materiais de referência padrão, situando-se os valores das concentrações para os ossos tipicamente fora do intervalo de valores dos padrões. Adicionalmente note-se que os materiais de referência padrão são pastilhas com uma estrutura muito diferente da do osso. No entanto, a técnica mostrou-se tal como esperado mais sensível para a análise de chumbo.

Quanto ao mapeamento dos elementos a microsonda nuclear apresenta uma melhor resolução espacial (3-10  $\mu\text{m}$ ) do que o M4-Tornado da Bruker (25 $\mu\text{m}$  para a risca K do molibdénio). Comparando os mapeamentos obtidos pelas duas técnicas (figura 71 b e c), a impressão de que é possível observar mais detalhe na figura 71 b) de  $\mu$ -PIXE por comparação com a figura 71 c) de  $\mu$ -XRF deverá ser em grande parte devida à limitação do software ligado ao  $\mu$ -XRF de não implementar um código de cores proporcional ao rendimento de raios-X. Para além de uma observação estrutural de razoável uniformidade nas concentrações de cálcio e fósforo não foi possível obter com as duas técnicas informação relevante de mapeamentos de elementos traço.

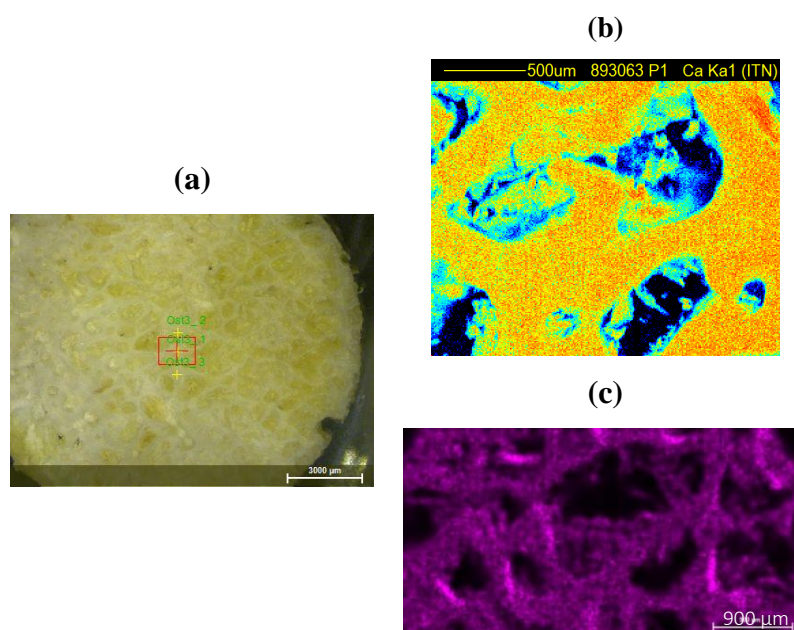


Figura 71) (a) Secção número 3 do osso osteoporótico 2 e mapeamento de cálcio (b) obtido por  $\mu$ -PIXE na microsonda nuclear no CTN/IST e (c) obtido por  $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado da Bruker.

As diferenças observadas nas concentrações dos vários elementos, obtidas por PIXE / PIGE e por  $\mu$ -XRF, podem dever-se, como tem sido referido ao longo deste capítulo, aos efeitos

geométricos na amostra. Para se tentar perceber estes efeitos foram feitas pastilhas usando secções do osso saudável. As secções números 5 e 6 do osso saudável foram colocadas no moinho e com o auxílio de esferas de zircónia procedeu-se à moagem, arrefecida a azoto líquido, que durou cerca de 15 min até haver pó suficiente para fazer a pastilha. Este pó foi colocado num recipiente e depois prensado. A pastilha foi depois colocada no forno a uma temperatura de 50°C durante 24h. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 37.

		$\mu$ -XRF Pastilha			$\mu$ -XRF Osso não Pastilhado			PIXE/PIGE Pastilha		
<b>Concentração (%m/m)</b>	<b>Ca</b>	18.4	±	0.9	23.9	±	2.8	20.6	±	0.7
	<b>P</b>	6.2	±	0.3	9.1	±	0.9	7.6	±	0.3
<b>Concentração (µg/g)</b>	<b>Zn</b>	178	±	9	195	±	19	174	±	23
	<b>Sr</b>	68	±	3	75	±	8	79	±	43
	<b>Na</b>	-	-	-	-	-	-	2000	±	58
	<b>Ca/P</b>	3.1	±	0.4	2.7	±	0.2	2.5	±	0.2

Tabela 37) Resultados da concentração dos elementos e da razão Ca/P para osso pastilhado, obtidos por  $\mu$ -XRF no espectrómetro M4-Tornado e por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares. São também apresentados os resultados de  $\mu$ -XRF para osso não pastilhado, que correspondem à média dos valores obtidos para as secções números 5 e 6, que foram usadas para fazer a pastilha.

Apesar das várias tentativas não foi possível analisar pastilha de osso pagético e de osso osteoporótico, pois o osso depois de prensado ficava sempre com muita gordura e era muito difícil obter uma pastilha homogénea. Não são apresentados os resultados da análise de osso não pastilhado por PIXE e PIGE, pois estas amostras não foram analisadas por estas técnicas. No entanto, os resultados da tabela 37 permitem concluir que a concentração de fósforo, de cálcio e de zinco, obtida por  $\mu$ -XRF para o osso não pastilhado é superior ao valor obtido quando se analisa uma pastilha do mesmo osso. Os valores das concentrações obtidos por  $\mu$ -XRF no osso pastilhado e por PIXE no osso pastilhado são concordantes, o que confirma o que foi dito acerca dos efeitos geométricos na atenuação dos raios-X do feixe primário e dos raios-X característicos produzidos na amostra quando se analisam amostras não homogéneas.

Relativamente aos resultados de  $\mu$ -XRF é ainda pertinente comentar o seguinte. Dado que foram feitos espectros sem filtro e com filtro para quantificar os elementos mais pesados, foi possível quantificar cálcio, fósforo, zinco e estrôncio, em ambos os tipos de espectros. Em geral, os resultados obtidos com filtro e sem filtro não coincidem, nem mesmo dentro do intervalo de



incerteza que já é por si grande. Um dos motivos poderá ser o fato de os pontos analisados numa configuração e na outra não serem exatamente os mesmos. Contudo, dado que foi feita uma média de 10 pontos seria de esperar um melhor acordo. Outro motivo terá a ver com o algoritmo de quantificação que poderá ter alguma limitação. Seria desejável para entender esta discrepância obter para uma amostra homogênea não porosa, por exemplo uma pastilha de osso ou pastilha de fosfato de cálcio, resultados para análises com filtro e sem filtro.

## **2. Análise da Patologia**

Embora a amostragem seja insuficiente para poderem ser tiradas conclusões clínicas, a análise dos resultados obtidos mostra claras diferenças entre o osso com patologia e o osso saudável. A análise é especialmente interessante dado que os estudos com osso pagético são escassos. Não existe nenhum estudo publicado em que sejam aplicadas técnicas de análise com feixe de iões ao estudo da doença óssea de Paget. Só recentemente foi publicado um estudo da análise por espectroscopia de fluorescência de raios-X de amostras de osso pagético, mas estas amostras são provenientes do banco de ossos. A osteoporose apesar de ser uma doença óssea muito estudada dado que afeta mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo e que as fraturas osteoporóticas são uma das principais causas de mortalidade nos idosos, os resultados publicados sobre as medições da razão Ca/P, e da distribuição dos elementos em tecido ósseo são também escassas.

A análise dos resultados de PIXE e PIGE das tabelas 17 e 21 mostram que a concentração de cálcio, de zinco e de estrôncio são superiores no osso com DOP por comparação com o osso saudável, para todas as secções de osso. Para além disso, verifica-se também que os valores obtidos para a razão Ca/P são superiores ao valor obtido para o osso saudável exceto para a última secção. Os resultados obtidos na análise em profundidade do osso parecem dar uma indicação da extensão da DOP no osso. As concentrações de zinco encontradas no osso pagético são muito superiores às encontradas para o osso saudável e também por comparação com os valores publicados na literatura para osso saudável [4, 123]. Este resultado é particularmente interessante, dado que estudos publicados na literatura indicam que maiores concentrações de zinco são encontradas em locais de formação ativa de osso e, o osso com DOP é caracterizado por um aumento excessivo de formação de osso anómalo. Os valores obtidos para a razão Ca/P

para o osso saudável, estão de acordo com o valor teórico calculado com base nas percentagens de Ca e de P na estrutura da hidroxiapatite e que é aproximadamente 2.15. Estes valores estão também de acordo com os valores publicados na literatura para osso saudável [6], [7]. Os resultados obtidos para o zinco e para o estrôncio para osso saudável estão também de acordo com resultados publicados para osso trabecular saudável [131]. Tal como foi dito a razão Ca/P é maior para o osso com DOP por comparação com o osso saudável e superior aos valores encontrados para quase todos os ossos osteoporóticos. A exceção é o osso osteoporótico 3. E isso pode dever-se por exemplo ao fato de o paciente tomar suplementos, que contêm vários minerais como o cálcio, o fósforo, ferro, manganésio, zinco, entre outros. Pacientes de idades avançadas e com sintomas de osteoporose facilmente recorrem a este tipo de suplementos sem prescrição médica. Aliás, por análise do gráfico da figura 76 é possível ver que o osso osteoporótico 3 apresenta uma concentração de zinco mais elevada por comparação com os outros ossos osteoporóticos. Também foi possível verificar a presença de elementos como o manganésio e o crómio neste osso o que corrobora esta teoria.

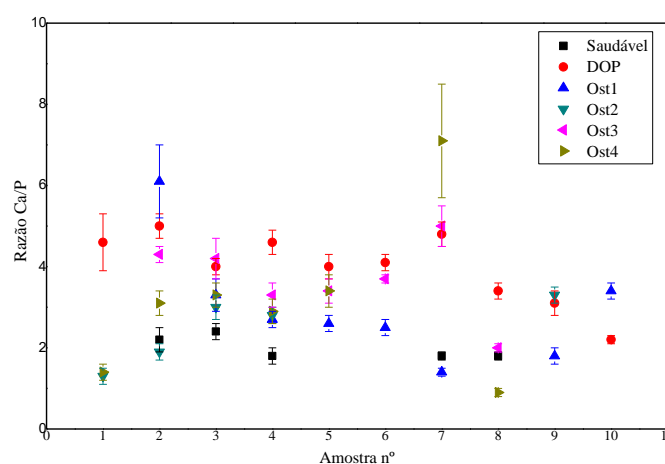


Figura 72) Gráfico da razão Ca/P para todas as secções para cada tipo de osso. Os valores apresentados correspondem aos valores médios para cada secção e a incerteza é calculado com base na dispersão.

O gráfico da figura 73 mostra a razão Ca/P medida por PIXE e PIGE para o osso com DOP, osso saudável e para todos os ossos osteoporóticos analisados. Os resultados apresentados correspondem às médias ponderadas dos valores obtidos para cada secção de osso trabecular (todas as amostras exceto a primeira). As incertezas são calculadas com base no desvio padrão e com a incerteza de cada secção. Os resultados de PIXE permitem verificar que a razão Ca/P para o osso com DOP é superior à razão Ca/P obtida para o osso saudável e para todos os ossos osteoporóticos com exceção do osso osteoporótico 3. A razão Ca/P obtida para os ossos osteoporóticos é também superior à obtida para o osso saudável.

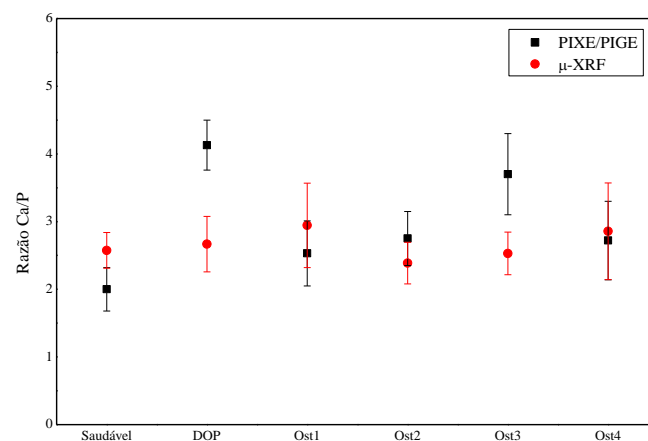


Figura 73) Razão Ca/P para tecido trabecular para todas as amostras analisadas.

Os gráficos das figuras 74 -77, mostram as concentrações de Ca, P, Zn e Sr para o osso com DOP, osso saudável e para todos os ossos osteoporóticos analisados. O valor mostrado é o valor médio calculado com base nos valores obtidos para todas as secções de tecido trabecular, e as incertezas são calculadas com base na dispersão dos resultados.

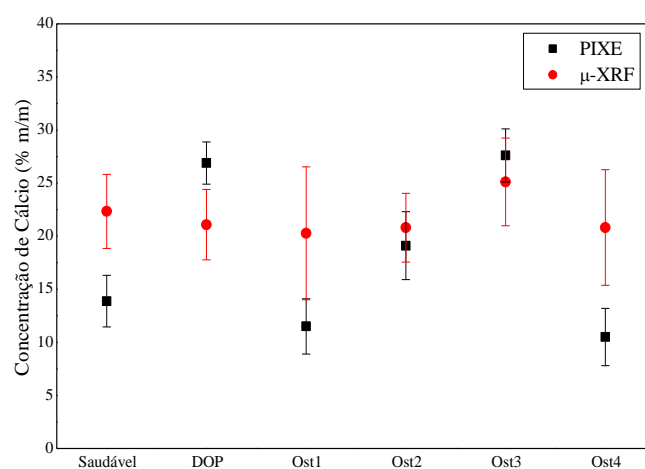


Figura 74) Gráfico da concentração de cálcio (% m/m) para osso saudável, osso com DOP e osso com osteoporose.

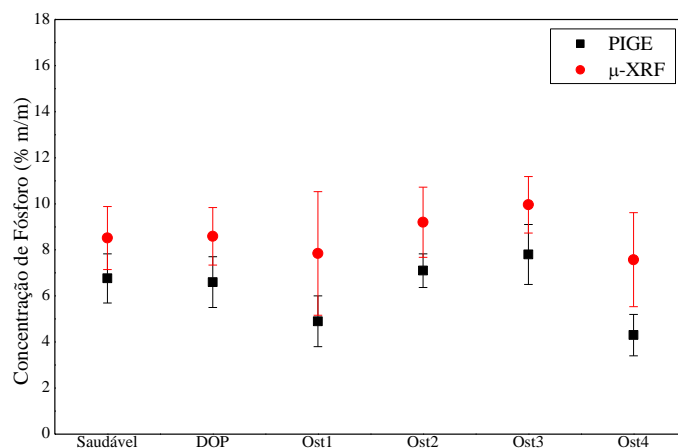


Figura 75) Gráfico da concentração de fósforo (% m/m) para osso saudável, osso com DOP e osso com osteoporose.

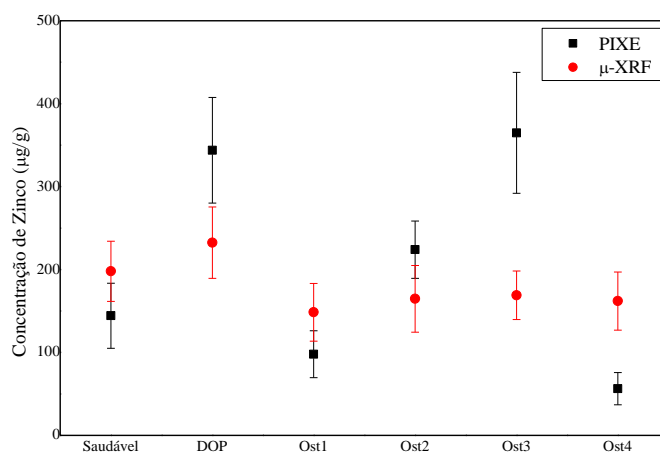


Figura 76) Gráfico da concentração de zinco (μg/g) para osso saudável, osso com DOP e osso com osteoporose.

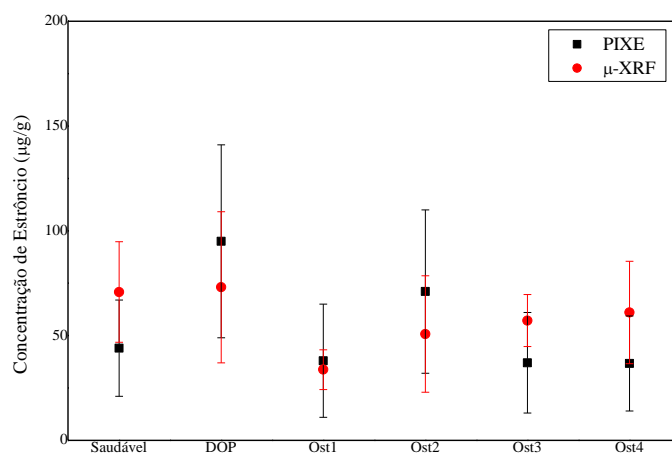


Figura 77) Gráfico da concentração de estrôncio (μg/g) para osso saudável, osso com DOP e osso com osteoporose.

Dado que a concentração de zinco está relacionada com áreas ativas de remodelação óssea, parece haver uma relação entre a concentração de zinco e o grau de mineralização do osso. O gráfico da figura 78 mostra a relação entre a concentração de zinco e a razão Ca/P obtida para todos os ossos analisados. Mais uma vez, os valores apresentados correspondem à média dos valores obtidos para todas as amostras com exceção daquelas que podem conter cartilagem.

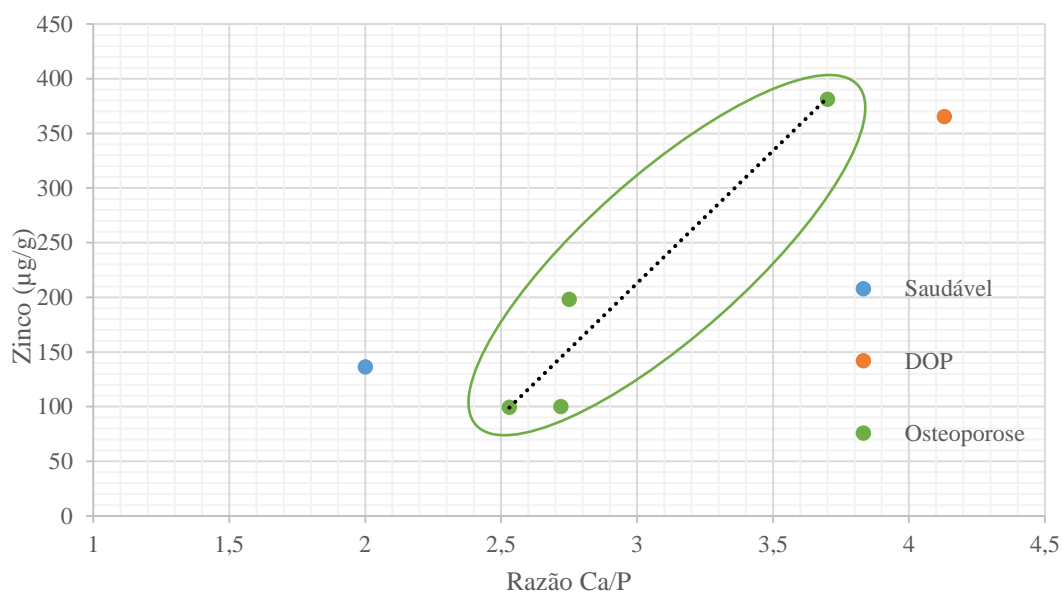


Figura 78) Gráfico da concentração de zinco (µg/g) em função da razão Ca/P para todas as amostras de osso.

Como é possível observar, a dependência da concentração de zinco da razão Ca/P segue uma tendência aproximadamente linear para o osso osteoporótico. O osso com DOP está à direita desta tendência e o osso saudável está à esquerda. Este parece ser um bom critério, por exemplo, para um diagnóstico de patologias ósseas e classificação de osteoporose. É preciso analisar um maior número de amostras para aferir se a dispersão dos pontos segue a tendência descrita.

## Conclusões

---

As técnicas de análise por feixe de iões, PIXE e PIGE, e micro- fluorescência de raios-X,  $\mu$ -XRF, são adequadas à análise da composição elementar de amostras ósseas. No entanto, no caso da técnica de  $\mu$ -XRF o fato de os raios-X do feixe primário (com energias até 50 keV) atravessarem toda a amostra faz com que os efeitos geométricos da análise de matriz de osso que tem muitas lacunas sejam mais pronunciados. Além disso, a quantificação em  $\mu$ -XRF foi feita por comparação com materiais de referência padrão de osso com concentrações conhecidas. Estes efeitos geométricos surgem também do fato de os materiais de referência padrão serem pastilhas, com uma estrutura muito diferente da do osso. Assim, os resultados de  $\mu$ -XRF não permitiram verificar diferenças entre o osso saudável e osso com patologia. As técnicas de PIXE e PIGE quando se analisam amostras com este tipo de geometria têm como vantagem o fato de que o alcance dos prótons em tecido ósseo ser aproximadamente 100  $\mu$ m. Para além disso, no caso da técnica de PIGE a atenuação da radiação gama no seu percurso para o exterior da amostra é desprezável. Os resultados das análises simultâneas de PIXE e de PIGE permitem distinguir claramente entre osso saudável e osso com patologia para o Ca, o P e o Zn e para a razão Ca/P. As condições experimentais podem ser otimizadas para melhorar os limites de deteção dos elementos de elevado Z. O aumento da energia traz vantagens no caso da técnica de PIGE para quantificação do fósforo e do magnésio. No caso da técnica de PIXE, ao aumentar a energia deverão ser utilizados filtros adicionais devido ao pico muito intenso do cálcio.

O tipo de corte dos ossos (figura 48) permitiu uma análise da distribuição dos elementos ao longo da profundidade do osso no sentido em que é aplicada carga mecânica e permitiu, (1) a análise elementar de tecido da cartilagem, (2) a análise elementar de tecido trabecular e (3) verificar a distribuição dos elementos maioritários e traço na cabeça do fémur. No caso do osso com DOP, como é uma doença localizada, este tipo de corte permitiu obter uma indicação da extensão da doença no osso. Neste caso em particular, a razão Ca/P obtida para as duas últimas amostras de osso pagético é inferior à obtida para as restantes amostras.

No osso afetado com doença óssea de Paget para além de se ter registado uma razão Ca/P e uma concentração de zinco superior à do osso saudável e à dos ossos osteoporóticos, foi também possível encontrar chumbo, um elemento altamente tóxico que tem efeitos diretos na função dos osteoblastos e dos osteoclastos. Este resultado é interessante pois, (1) a DOP tem início numa atividade descontrolada dos osteoclastos, que apresentam várias anormalidades

celulares, (2) a DOP é mais frequente em certas regiões de um determinado país e afeta sobretudo pessoas que habitam zonas rurais e (3) a prevalência e a severidade da doença têm diminuído ao longo dos anos. Estes dados parecem indicar que a doença pode estar associada a uma exposição ambiental e nesse sentido este resultado do chumbo é particularmente interessante. Outros estudos registam também elevadas concentrações de chumbo em ossos com DOP.

Um dos aspetos com importância potencialmente elevada desta tese é a relação linear que se estabeleceu para ossos com osteoporose entre a concentração de zinco e a razão Ca/P (figura 78). Além disso a correlação entre estas duas grandezas permite distinguir claramente o osso saudável, com osteoporose e com doença óssea de Paget. Este resultado deverá ser investigado alargando a amostragem, visto que poderá vir a ser utilizado como um índice de diagnóstico mais fiável e independente de fatores exteriores ao paciente, como o índice Z ou o índice T usados para DEXA que dependem de valores de densidade mineral óssea medidos com base num grupo de referência.

## Referências

---

- [1] Zoeger, N., Wobrauschek, P., Streli, C., Pepponi, G., Roschger, P., Falkenberg, G., Osterode, W., X-Ray Spectrom 34 (2005) 140–143 (DOI: 10.1002/xrs.788)
- [2] Brodziak-Dopierala, B., Kwapulinski, J., Kusz, D., Gajda, Z., Sobczyk, K., Arch Environ Contam Toxicol 57 (2009) 203-210 (DOI 10.1007/s00244-008-9228-0)
- [3] Darrah, T. H., Ph.D. thesis, New York 2009
- [4] Zaichick, V., Biol Trace Elem Res (2013) 153: 84-99
- [5] Woittiez, J. R. W., Das, H. A., Journal of Radioanalytical Chemistry 59 (1980) 213-219
- [6] Zaichick, V., Tzaphlidou, M., Applied Radiation and Isotopes 56 (2002) 781-786
- [7] Fei, Y., Zhang, M., Li, M., Huang, Y., He, W., Ding, W., Yang, J., Micron 38 (2007) 637-642
- [8] Zhang, Y. X., Wang, Y. S., Zhang, G. L., Huang, Y. Y., He, W., Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 260(1) (2007) 178-183 (DOI:10.1016/j.nimb.2007.02.013)
- [9] Pemmer, B., Roschger, A., Wastl, A., Hofstaetter, J. G., Wobrauschek, P., Simon, R., Thaler, H. W., Roschger, P., Klaushofer, K., Streli, C., Bone 57 (2013) 184–193
- [10] Caruso, E., Braga Marcazzan, G. M., Redaelli, P., Bonucci, E., Ballanti, P., Mazzaferro, S., Coen, G., Biological Trace Element Research 10 (1986) 123-127
- [11] Ynsa, M. D., Pinheiro, T., Ager, F. J., Alves, L. C., Millán, J. C., Gómez-Zubelbia, M. A., Respaldiza, M. A., Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 189 (2002) 431-436
- [12] Reinert, T., Reibetanz, U., Vogt, J., Butz, T., Werner, A., Gründer, W., Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 181 (2001) 516-521 ([http://dx.doi.org/10.1016/S0168-583X\(01\)00481-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-583X(01)00481-5))
- [13] Zhang, Y., Zhang, Y., Tong, Y., Qiu, S., Wu, X., Dai, K., J. Radioanal. Nucl. Chem. 212 (5) (1996) 341-351
- [14] Kaabar, W., Gundogdu, O., Lakloul, A., Pfeiffer, F., Farquharson, M. J., Bradley, D. A., Applied Radiation and Isotopes 68 (2010) 730-734
- [15] Kaabar, W., Daar, E., Gundogdu, O., Jenneson, P. M., Farquharson, M. J., Webb, M., Jeynes, C., Bradley, D. A., Applied Radiation and Isotopes 67 (2009) 475-479.
- [16] Hyvönen-Dabek, M., Journal of Radioanalytical Chemistry 63 (1981) 367-378
- [17] Samudralwar, D. L., and Robertson, J. D., Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 169 (1993) 259-267
- [18] Mescher, A. L., Junqueira's Basic Histology – Text & Atlas, McGraw Hill Professional, 12<sup>th</sup> Edition, 2009
- [19] Kyriazis, V., and Tzaphlidou, M., The Scientific World JOURNAL 4 (2004) 1027-1034
- [20] Nyman, J. S., Reyes, M., and Wang, X., Micron 36 (2005) 566-582



- [21] Iyengar, G. V., Tandon, L., Minor and Trace Elements in Human Bones and Teeth, International Atomic Energy Agency, Vienna (1999)
- [22] Zwanziger, H., Biological Trace Element Research 19 (1989) 195-232
- [23] Sambrook, P., Schrieber, L., Taylor, T., Ellis. A., The Musculoskeletal System- Basic Science and Clinical Conditions, Churchill Livingstone Elsevier, 2nd Editions, 2010 (Chapter 5)
- [24] Goissis., Análise estrutural do colagénio tipo I. Correlação Estrutura: Actividade Biológica; Dissertação de mestrado, 2007
- [25] Canhão, H. C. M., Dissertação de Doutoramento, Lisboa 2007
- [26] Seeman, E., and Delmas, P. D., N Engl J Med 354 (2006) 2250-2261
- [27] Santos, C., Fonseca, M., Corregidor, V., Alves, L. C., Luís, H., Capelão, M., Branco, J. C., Carvalho, P. A., and Jesus, A. P., Microscopy and Microanalysis 19(S4) (2003): 79-80 (DOI: 10.1017/S1431927613001013)
- [28] Raisz; L. G., The Journal of Clinical Investigation 115(12) (2005) 3318–3325 (doi:10.1172/JCI27071)
- [29] Tavares, V., Acta Reuma Port 31 (2006) S45-S46
- [30] Am J Med 94 (1993) 646-650
- [31] Szule, P., Bouxsein., M. L., Vertebral Fracture Initiative – Part I – Overview of osteoporosis: Epidemiology and clinical management, International Osteoporosis Foundation
- [32] Simon, L. S., Rheumatic Disease Clinics of North America 33 (2007) 149 – 176
- [33] World Health Organization, WHO Scientific Group on the Assessment of osteoporosis at Primary Health Care Level, 2007
- [34] Branco, J. C., Grandes Síndromes em Reumatologia, LIDEL, 2006 (82-87)
- [35] Carmona, R. H., Bone Health and Osteoporosis – A Report of the Surgeon General, Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General, 2004
- [36] Lane, N.E., Am. J. Obstet. Gynecol. 194 (2006) S3–S11
- [37] Canhão, H., Fonseca, J. E., and Queiroz, M. V., ACTA REUM PORT. 30 (2005) 225-240
- [38] Cummings, S. R., Melton III. L. J., THE LANCET 359 (2002) 1761-1767
- [39] Kanis, J. A., WHO, Assessment of osteoporosis at the primary health-care level. Technical Report, World Health Organization Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases, University of Sheffield, UK, 2007
- [40] Kanis, J. A., Johnell, O., Oden, A., Jonsson, B., De Laet, C., Dawson, A., Bone 27 (5) (2000) 585-590
- [41] Cooper, C., Campion, G., and Melton, L. J., Osteoporos Int 2 (1992) 285–289
- [42] International Osteoporosis Foundation (IOF). World Osteoporosis Fact Sheet, 2000
- [43] Looker, A. C., Orwoll, E. S., Johnston, C. C. Jr, Lindsay, E. L., Wahner, H. W., Dunn, W. L., Calvo, M. S., Harris, T. B., and Heyse, S. P., J Bone Miner Res 12 (1997) 1761-1768
- [44] Branco, J. C., Osteoporose atinge cerca de 500 mil pessoas em Portugal, Expresso Saúde Pública, 2086 (2012) 2
- [45] Araújo, D., Pereira, J., e Barros, H., Acta Reumatológica Port 82 (1997) 7-13

- [46] Branco, J. C., Tavares, V., Brios, A., Costa, R., Feliciano, R., and Rola, A., *Osteoporosis Int* 8 (Suppl 3) (1998) S191
- [47] Pina, M. F., Alves, S. M., Barbosa, M., and Barros, H., *Osteoporosis International* 19(12) (2008) 12: 1797-1804
- [48] Manolagas, S. C., and Jilka, R. L., *N Engl J Med* 332 (1995) 305-311
- [49] Bell, K. L., Loveridge, N., Jordan, G. R., Power, J., Constant, C. R., and Reeve, J., *Bone* (2000) 29:297-304
- [50] Van Der Linden, J. C., Homminga, J., Verhaar, J. A. N., and Weinans, H., *Journal of Bone and Mineral Research* 16 (2001) 457-465 (10.1359/jbmr.2001.16.3.457)
- [51] Eastell, R., *Medicine* 33(12) (2005) 61-65
- [52] Bartl, R., Frisch, B., *Osteoporosis – Diagnosis, Prevention, Therapy – A practical guide for all physicians – from Pediatrics to Geriatrics*, Springer Berlin Heidelberg, 2004 (DOI: 10.1007/978-3-662-09163-0)
- [53] Hui, S. L., Slemenda, C. W., Johnston Jr., C. C., *Osteoporosis International* 1(1) (1990) 30-34
- [54] Riggs, B. L. and Melton, L. J., *N Engl J Med* 314 (26) (1986) 1676-1686
- [55] Cooper, G. S., and Umbach, D. M., *Journal of Bone and Mineral Research* 11(12) (1996) 1841-1849
- [56] Lips, P., *Endocr Rev* 22 (2001) 477-501
- [57] Horowitz, M. C., *Science* 260 (1993) 626-627 (DOI: 10.1126/science.8480174)
- [58] Kerstin, H., et al., *Osteoporosis – Prevention, Diagnostics and Treatment. A systematic review of the literature*, Swedish Council of Technology Assessment in Health Care (SBU), 2003
- [59] Makovey, J., Nguyen, T. V., Naganathan, V., Wark, J. D., and Sambrook, P. N., *Journal of Bone and Mineral Research* 22 (11) (2007) 1773-1780 (10.1359/jbmr.070708)
- [60] Kenny, A. M., and Prestwood, K. M., *Rheum Dis Clin North Am* 26 (2006) 569-591
- [61] Eisman, J. A., *Endocr Rev*. 20(6) (1999) 788-804
- [62] Zhai, G., Andrew, T., Kato, B. S., Blake, G. M., and Spector, T. D., *Osteoporosis Int* 20 (2009) 949-953
- [63] Eisman, A., Hopper, J. L., Yeates, M. G., Sambrook, P. N., and Eberl, S., *J. Clin. Invest.* Volume 80 (1987) 706-71
- [64] Christian, J. C., Yu, P., Slemenda, C. W., and Johnston Jr, C. C., *Am. J. Hum. Genet.* 44 (1989) 429-433
- [65] Brown, M. A., Haughton, M. A., Grant, S. F., Gunnell, A. S., Henderson, N. K., and Eisman, J. A., *J Bone Miner Res* 16 (2001) 758-764
- [66] Jilka, R. L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D. C., Abrams, J. S., Boyce, B., Broxmeyer, H., and Manolagas, S. C., *Science* 257(5066) (1992) 88-91
- [67] Stevenson, J. C., Lees, B., Devenport, M., Cust, M. P., and Ganger, K. F., *BMJ* 298(6678) (1989) 924-928
- [68] Lane, N. E., *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 194 (2006) S3-11
- [69] Heaney, R. P., *Bone and Mineral Research* 4 (1986) 255-301

- [70] Paget, J., *Med Chir Trans* 60 (1876) 37–64
- [71] Siris, E. S., *Journal of Bone and Mineral Research* 13(7) (1998) 1061-1065
- [72] Langston, A. L. and Ralston, S. H., *Rheumatology* 43 (2004) 955-959
- [73] Cravo, A. R., *spreumatologia* 11(S55) (2011) 14-17
- [74] Seton, M., Moses, A. M., Bode, R. K., Schwartz, C., *Bone* 48 (2011) 281-285
- [75] Rousière, M., Michou, L., Cornélis, F., Orcel, P., *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 17 (2003) 1019-1041
- [76] Colina, M., La Corte, R., De Leonardis, F., Trotta, F., *Rheumatol Int* 28 (2008) 1069-1075
- [77] Ralston, S. H., *Bone* 43 (2008) 819-825
- [78] Cooper, C., Harvey, N. C., Dennison, E., Staa, T. P. V., *Journal of Bone and Mineral Research*, 21 (Suppl. 2) (2006) 3-8
- [79] Singer, F. R., Mills, B. G., Gruber, H. E., Windle, J. J., Roodman, G. D., *Journal of Bone and Mineral Research*, 21 (Suppl. 2) (2006) 51-54
- [80] Lee, W. R., *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 49B (1967) 146-153
- [81] Favus, M. J., Vokes, T. J., *Harrison's principles of internal medicine*, McGraw-Hill Medical, New York (2012)
- [82] Basle, M. F., Russell, W. C., Goswami, K. K. A., Rebel, A., Giraudon, P., Wild, F., Filmon, R., *J. Gen. Virol.* 66 (1985) 2103-2110
- [83] Helfrich, M. H., Hobson, R. P., Grabowski, P. S., Zurbriggen, A., Cosby, S. L., Dickson, G. R., Fraser, W. D., OOI, C. G., Selby, P. L., Crisp, A. J., Wallace, R. G. H., Kahn, S., Ralston, S. H., *Journal of Bone and Mineral Research*, 15 (2000) 2315-2328
- [84] Ooi, C. G., Walsh, C. A., Gallagher, J. A., Fraser, W. D., *Bone* 27 (2000) 417-421
- [85] Mills, B. G., Singer, F. R., Weiner, L. P., Holst, P.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 (1981) 1209-1213
- [86] José, F. F., Pernambuco, A. C. A., Amaral, D. T., *Einstein*, 6 (Supl. 1) (2008) S79-S88
- [87] Hocking, L., Slee, F., Haslam, S. I., Cundy, T., Nicholson, G., Van Hul, W., Ralston, S. H., *Bone* 26 (2000) 577-580
- [88] Cody, J. D., Singer, F. R., Roodman, G. D., Otterund, B., Lewis, T. B., Leppert, M., Leach, R. J., *Am. J. Hum. Genet.* 61 (1997) 1117-1122
- [89] Helfrich, M. H., Hocking, L. J., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473 (2008) 172-182
- [90] Dermience, M., Lognay, G., Mathieu, F., Goyens, P., *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 32 (2015) 86-106
- [91] Egden, L. M., Nguten, K., Chettle, D. R., Butler, R., Inskip, M. J., Webber, C. E., *X. Ray Spectrometry* 44 (2015) 221-225
- [92] Aras, N. K., Ataman, O. Y., *Trace Element Analysis of Food and Diet*; Springer 2006 (chapter 1)
- [93] Peacock, M., *Clin J Am Soc Nephrol* 5 (2010) S23-S30 (doi: 10.225/CJN.05910809)

- [94] Fenton, T. R., Lyon, A. W., Eliasziw, M., Tough, S. C., Hanley, D. A., *Nutrition Journal* 8 (41) (2009) 1-15 (doi:10.1186/1475-2891-8-41)
- [95] Sahpiro, R., Heaney, E. P., *Bone* 32 (2003) 532-540 (DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S8756-3282\(03\)00060](http://dx.doi.org/10.1016/S8756-3282(03)00060))
- [96] kourkoumelis, N., Balatsoukas, I., Tzaphlidou, M., *J Biol Phys* 38 (2012) 279-291
- [97] World Health Organization, *Trace elements in human nutrition and Health*; WHO Library Cataloguing in Publication Data, Geneva, 1996
- [98] Beattie, J. H., Avenell, A., *Nutrition Research Reviews* 5 (1992) 167-188
- [99] Lappalainen, R., Knuuttila, M., Lammi, S., Alhava, E. M., Olkkonen, H., *Acta Orthopedic scand.* 53 (1982) 51-55
- [100] Hadley, K. B., Newman, S. M., Hunt, J. R., *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21 (2010) 297-303
- [101] Yamaguchi, M., *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 11 (1998) 119-135
- [102] Batra, G. J., Bewley, D. K., *J. Radioanal. Chem.* 16 (1973) 275-280
- [103] Ovesen, J., Møller-Madsen, B., Nielsen, P. T., Christensen, P. H., Simonsen, O., Hoeck, H. C., Laursen, M. B., Thomsen, J. S., *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 23 (2009) 1-8
- [104] Brzóška, M. M., Galażyn-Sidorczyk, M., Rogalska, J., Roszczenko, A., Jurczuk, M., Majewska, K., Moniuszko-Jakoniuk, J., *Chemico-Biological Interactions* 171 (2008) 312-324
- [105] Molokwu, C. O., Li, Y. V., *Ohio research and Clinical Review* 15 (2006)
- [106] Reffitt, D., Ogston, N., Jugdaohsingh, R., Cheug, H. F. J., Evans, B. A. J., Thompson, R. P. H., Powell, J. J., Hampson, G. N., *Bone* 32 (2003) 127-135
- [107] Carlisle, E. M., *Calcif. Tissue Int.* 33 (1981) 27-34
- [108] Jugdaohsingh, R., *J Nutr health Aging* 11(2) (2007) 99-110
- [109] Jugdaohsingh, R., Tucker, K. L., Qiao, N., et al, *J of Bone and mineral research*, 19 (2004) 297-307
- [110] Bae, Y., Kim, J., Choi, M., Chung, Y., Kim, M., *Biol trace Elem res.* 124 (2008) 157-163
- [111] Dahl, S. G., Allain, P., Marie, P.J., Mauras, Y., Boivin, G., Ammann, P., Tsouderos, Y., Delmas, P. D., Christiansen, C., *Bone* 28(4) (2001) 446 - 453
- [112] Pak, C. Y. C., Zerwekh, J. E., Antich, P., *TEM* 6 (7) 1995
- [113] Patel, S., Chan, J. K. M., Hosking, D. J., *Bone* (19) (1996) 651-655
- [114] Reginster, J. Y., Meurmans, L., Zegels, B., et al, *Ann. Intern. Med.* 129 (1998) 1-8
- [115] Lowe, N. M., Fraser, W. D., Jackson, M. J., *Nutrition Society.* 61 (2002) 181-185
- [116] Satarug, S., Baker, J. R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P. E., Williams, D. J., Moore, M. R., *Toxicol. Lett.* 137 (2003) 65-83
- [117] Knuuttila, M., Lappalainen, R., Olkkonen, H., Lammim S., Alhava, E. M., *Arch Environ Health.* 37(5) (1982) 290-294
- [118] Berglund, M., Akesson, A., Bjellerup, P., Vahter, M., *Toxicology letters* 112-113 (2000) 219-225

- [119] Dowd, T. L., Rosen, J. F., Mints, L., Gundberg, C. M., *Biochimica et Biophysica Acta* 1535 (2001) 153 – 163
- [120] Pounds, J. G., Long, G. J., Rosen, J. F., *Environmental Health Perspectives* 91 (1991) 17-32
- [121] Roseberry, H. H., Hastings, A. B., Morse, J. K., *The Journal of Biological Chemistry* XC(2) (1930) 395-407
- [122] Haumont, S., *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 9 (1961) 141-145
- [123] Tzaphlidou, M., Zaichick, V., *Biological Trace Element Research* 93 (2003) 63-74
- [124] Alves L, A *Microsonda Nuclear do CFNUL/ITN: Desenvolvimento Experimental e Aplicações*, Dissertação de doutoramento, 2003
- [125] Tabacniks, M., *Análise de filmes finos por PIXE e RBS*, Dissertação de doutoramento, 2006
- [126] Cahill, T. A., Miranda, J., Morales, R., *Int. J. PIXE*, 1(4) 1991 297-310
- [127] Verma, H. R., *Atomic and Nuclear Analytical Methods*, Springer, 2007
- [128] Krause, M. O., *J. Phys. Chem.* 8(2) (1979) 307-327
- [129] Wang, Y., Nastasi, M., *Handbook of Modern Ion Beam Materials Analysis*, Materials Research Society, 2nd Edition, 2009
- [130] Johansson, S. A. E., Campbell, J. L., Malmqvist, K. G., *Particle-Induced X-Ray Emission Spectrometry*, John Wiley & Sons, 1995
- [131] Van Grieken, R. E., *Handbook of X-Ray Spectrometry. Methods and Techniques*, Marcel Dekker, 2nd Edition, 2002
- [132] <http://www.canberra.com/> - WinAxil X-Ray Analysis Software, Canberra
- [133] Knoll, G. F., *Radiation detection and measurement – third edition*, John Wiley & Sons Inc, 2000
- [134] Krane K. S., *Introductory Nuclear Physics*, John Wiley & Sons, 1988
- [135] Ziegler, J. F., Ziegler, M. D., Biersack, J. P., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 268 (2010) 1818–1823
- [136] Mukoyama, T., *Higher-Order Processes in Ion-Atom Collisions; Proceedings of the 10th International Conference on Particle Induced X-ray Emission and its Analytical Applications*, 2004
- [137] Lapicki, G., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 241 (2005) 34-42
- [138] Ouziane S., Amokrane, A., Zilabdi, M., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 161-163(4) (2000) 141-144
- [139] Van Grieken, R. E., *Handbook of X-Ray Spectrometry. Methods and Techniques*, 2nd Edition, Marcel Dekker, 2002
- [140] [www.ibandl.pt](http://www.ibandl.pt)
- [141] Fonseca, M., Jesus, A. P., Luís, H., Mateus, R., Cruz, J., Gasquez, L., Galaviz, D., Ribeiro, J. P., *Nucl. Inst. Methods B* 268 (2010), 1806-1808
- [142] Mateus, R., *Recolha Automática de Aerossóis e sua Análise por Técnicas Analíticas Nucleares*, Dissertação para Obtenção do Grau de Doutor em Física, 2003

- [143] Relly, D., Ensslin, N., Smith Jr., H., Kreiner, S., Passive Nondestructive Assay of Nuclear Materials, US Nuclear Regulatory Commission, 1991
- [144] Van Grieken, R. E., Markowicz, A., Handbook of X-Ray Spectrometry – Methods and Techniques, Marcel Dekker, 1993
- [145] Xin, S. Z., Song, Y. J., Lv, C., Rui, Y. K., Zhang, F. S., Xu, W. X., Wu, D., Wu, S. Wu, Zhong, J. Z., Chen, D. L., Chen, Q., Peng, F. T., Hort. Sci. (Prague) 36 (4) (2009) 133–139
- [146] <http://www.canberra.com/> - Canberra, WinAxil X-Ray Analysis
- [147] Van Espen, P., Lemberge, P., Advances in X-Ray Analysis 43 (2000) 560-569
- [148] <http://www.microbeams.co.uk/Products.html>
- [149] <https://www.bruker.com/pt/products/>
- [150] Shatendra, K. S., X-Ray Spectroscopy, In Tech, 2012
- [151] Fonseca, M., Análise de Elementos Leves por Reações Nucleares com Produção de Radiação Gama, Dissertação de Doutorado, 2010
- [152] Lofts, G., Jacaranda Physics 1, John Wiley & Sons Australia Lda, 2<sup>nd</sup> Edition, 2003
- [153] Tertian, R., Claisse, F., Principles of quantitative X-ray fluorescence analysis, Heyden, 1982
- [154] Schlotz, R., Uhlig, S., Introduction to X-Ray Fluorescence; 2000 - 2006 Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, West Germany
- [155] Dabrowski, K. M., Dul, D. T., Korecki, P., OPTICS EXPRESS 21(3) (2013) 2910-2927
- [156] Boni, C., Cereda, E., Marcazzan, G. M. B., Nuclear Instr. And Meth. In Physics Research B 35 (1988) 80-86
- [157] Jokar, A., Kakuee, O., Lamchi-Rachti, M., Nuclear Instr. And Meth. In Physics Research B 383 (2016) 152-155
- [158] Demortier, G., Bodart, F., Journal of Radioanalytical Chemistry 12 (1972) 209-219
- [159] Savidou, A., Aslanoglou, X., Paradellis, T., Pilakouta, M., Nuclear Instr. And Meth. In Physics Research B 152 (1999) 12-18
- [160] Kiss, Á. Z., Koltay, E., Nyakó, B., Somorjai, E., Anttila, A., Räisänen, J., Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 89(1) (1985) 123-141
- [161] Anttila, A., Hänninen, R., Räisänen, J., Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 62 (1981) 193-306
- [162] Mayer, M., A.I.P. Conf. Proc., 475 (1999) 541-544
- [163] Santos, C., Fonseca, M., Corregidor, V., Silva, H., Luís, H., Jesus, A. P., Branco, J., Alves, L. C., Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 331 (2014) 266-270
- [164] Alves, L. C., Breese, M. B. H., Alves, E., Paúl, A., Silva, M. R., Silva, M. F., Soares, J. C., Nuclear Instruments and Methods B 161 (2000) 334-338
- [165] Maxwell, J. A., Teesdale, W. J., Campbell, J. L., Nuclear Instruments and Methods B 95 (1995) 407-421
- [166] Barradas, N. P., Jeynes, C., Webb, R. P., Applied Physics Letters 71 (1997) 291-293

- [167] Karaaslan, F., Mutlu, M., Mermerkaya, M. U., Karaoğlu, S., Saçmacı, Ş., Kartal, Ş., *Clinical Interventions in Aging* 9 (2014) 1375-1382
- [168] <http://physics.nist.gov/cgi-bin/Xcom/xcom2>
- [169] Boerckel, J. D., Mason, D., McDermott, A. M., Alsberg, E., *Stem Cell Research & Therapy* 5(144) (2014) 1-12
- [170] Shepherd, D. E. T., Seedhom, B. B., *Ann Rheum Dis* 58 (1999) 27-34
- [171] Karp, H. J., Ketola, M. E., Lamberg-Allardt, C. J. E., *British Journal of Nutrition* 102 (2009) 1341-1347
- [172] Sakhaee, K., Maalouf, N. M., Abrams, S. A., Pak, C. Y. C., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (2005) 3528–3533

# Anexo 1

A tabela C1.1 apresenta os valores da secção eficaz (mbarn) e da secção eficaz diferencial (mbarn/sr) para a gama de energias medidas (2621 – 3950 keV).

Energia (keV)	Secção Eficaz (mbarn)	Secção Eficaz Diferencial (mbarn/sr)	Energia (keV)	Secção Eficaz (mbarn)	Secção Eficaz Diferencial (mbarn/sr)
2621	1.169E+00	9.305E-02	3262	5.309E+01	4.225E+00
2631	1.609E+00	1.281E-01	3267	4.555E+01	3.625E+00
2641	5.449E+00	4.336E-01	3273	3.868E+01	3.078E+00
2653	8.067E+00	6.420E-01	3277	2.749E+01	2.188E+00
2659	2.714E+01	2.160E+00	3282	2.340E+01	1.862E+00
2661	4.115E+01	3.275E+00	3287	2.146E+01	1.708E+00
2663	7.129E+01	5.673E+00	3292	1.877E+01	1.494E+00
2666	1.075E+02	8.551E+00	3297	1.986E+01	1.580E+00
2669	1.149E+02	9.140E+00	3318	2.539E+01	2.021E+00
2671	7.972E+01	6.344E+00	3338	3.961E+01	3.152E+00
2676	4.260E+01	3.390E+00	3357	4.900E+01	3.900E+00
2680	2.117E+01	1.684E+00	3367	3.649E+01	2.904E+00
2689	1.346E+01	1.071E+00	3377	2.471E+01	1.966E+00
2696	1.432E+01	1.139E+00	3387	2.718E+01	2.163E+00
2705	1.946E+01	1.548E+00	3397	4.301E+01	3.422E+00
2712	3.102E+01	2.468E+00	3406	4.079E+01	3.246E+00
2721	5.240E+01	4.170E+00	3417	3.357E+01	2.671E+00
2728	6.331E+01	5.038E+00	3427	3.198E+01	2.545E+00
2732	7.446E+01	5.925E+00	3437	6.307E+01	5.019E+00
2736	6.759E+01	5.379E+00	3439	8.101E+01	6.447E+00
2741	6.245E+01	4.969E+00	3440	8.438E+01	6.715E+00
2745	5.686E+01	4.525E+00	3442	8.748E+01	6.961E+00
2752	4.261E+01	3.390E+00	3444	6.830E+01	5.435E+00
2761	2.866E+01	2.281E+00	3446	5.439E+01	4.328E+00
2768	2.383E+01	1.897E+00	3451	6.698E+01	5.330E+00
2776	2.027E+01	1.613E+00	3457	8.034E+01	6.394E+00
2784	1.273E+01	1.013E+00	3462	4.950E+01	3.939E+00
2792	1.376E+01	1.095E+00	3467	2.996E+01	2.384E+00
2800	1.035E+01	8.238E-01	3471	2.386E+01	1.898E+00
2808	1.024E+01	8.148E-01	3477	2.095E+01	1.667E+00
2816	1.024E+01	8.148E-01	3482	2.294E+01	1.826E+00
2824	1.528E+01	1.216E+00	3487	2.363E+01	1.881E+00
2828	3.376E+01	2.686E+00	3492	2.089E+01	1.662E+00
2830	7.113E+01	5.660E+00	3498	2.674E+01	2.128E+00
2832	2.966E+01	2.360E+00	3502	3.054E+01	2.430E+00
2834	2.230E+01	1.774E+00	3507	3.585E+01	2.853E+00
2838	3.032E+01	2.412E+00	3512	2.797E+01	2.226E+00
2841	3.440E+01	2.737E+00	3515	3.283E+01	2.613E+00
2842	3.375E+01	2.686E+00	3516	2.889E+01	2.299E+00
2843	3.272E+01	2.604E+00	3517	3.315E+01	2.638E+00
2847	2.644E+01	2.104E+00	3519	3.029E+01	2.411E+00



<b>2855</b>	1.657E+01	1.319E+00	<b>3520</b>	2.552E+01	2.031E+00
<b>2859</b>	2.738E+01	2.179E+00	<b>3524</b>	2.556E+01	2.034E+00
<b>2861</b>	5.934E+01	4.722E+00	<b>3528</b>	2.865E+01	2.280E+00
<b>2861</b>	1.023E+02	8.143E+00	<b>3532</b>	3.554E+01	2.828E+00
<b>2862</b>	1.058E+02	8.415E+00	<b>3536</b>	3.857E+01	3.070E+00
<b>2863</b>	6.290E+01	5.005E+00	<b>3541</b>	4.321E+01	3.439E+00
<b>2865</b>	5.221E+01	4.155E+00	<b>3544</b>	4.940E+01	3.931E+00
<b>2867</b>	2.892E+01	2.302E+00	<b>3547</b>	6.014E+01	4.786E+00
<b>2870</b>	3.506E+01	2.790E+00	<b>3552</b>	7.745E+01	6.164E+00
<b>2872</b>	4.129E+01	3.285E+00	<b>3556</b>	9.189E+01	7.312E+00
<b>2874</b>	4.350E+01	3.461E+00	<b>3560</b>	8.541E+01	6.797E+00
<b>2876</b>	4.066E+01	3.236E+00	<b>3564</b>	6.705E+01	5.336E+00
<b>2880</b>	3.204E+01	2.550E+00	<b>3568</b>	4.983E+01	3.966E+00
<b>2887</b>	1.262E+01	1.004E+00	<b>3571</b>	4.705E+01	3.744E+00
<b>2896</b>	7.871E+00	6.264E-01	<b>3576</b>	3.845E+01	3.060E+00
<b>2903</b>	1.145E+01	9.109E-01	<b>3580</b>	4.851E+01	3.860E+00
<b>2907</b>	1.311E+01	1.043E+00	<b>3584</b>	5.102E+01	4.060E+00
<b>2912</b>	1.268E+01	1.009E+00	<b>3588</b>	6.088E+01	4.844E+00
<b>2919</b>	1.335E+01	1.063E+00	<b>3592</b>	7.027E+01	5.592E+00
<b>2927</b>	1.197E+01	9.529E-01	<b>3595</b>	8.528E+01	6.786E+00
<b>2936</b>	1.764E+01	1.404E+00	<b>3596</b>	1.303E+02	1.037E+01
<b>2944</b>	2.697E+01	2.146E+00	<b>3596</b>	1.619E+02	1.288E+01
<b>2951</b>	3.889E+01	3.094E+00	<b>3598</b>	2.018E+02	1.606E+01
<b>2955</b>	5.089E+01	4.050E+00	<b>3599</b>	1.710E+02	1.361E+01
<b>2960</b>	6.894E+01	5.486E+00	<b>3599</b>	1.897E+02	1.510E+01
<b>2963</b>	6.877E+01	5.472E+00	<b>3601</b>	1.670E+02	1.329E+01
<b>2968</b>	6.989E+01	5.561E+00	<b>3603</b>	1.167E+02	9.287E+00
<b>2975</b>	6.227E+01	4.955E+00	<b>3606</b>	1.007E+02	8.017E+00
<b>2984</b>	4.789E+01	3.811E+00	<b>3612</b>	7.458E+01	5.935E+00
<b>2984</b>	3.971E+01	3.160E+00	<b>3616</b>	6.831E+01	5.436E+00
<b>2988</b>	3.671E+01	2.921E+00	<b>3620</b>	5.843E+01	4.650E+00
<b>2993</b>	4.406E+01	3.506E+00	<b>3626</b>	4.743E+01	3.774E+00
<b>2996</b>	2.490E+01	1.981E+00	<b>3630</b>	4.907E+01	3.905E+00
<b>3000</b>	2.021E+01	1.608E+00	<b>3636</b>	4.552E+01	3.622E+00
<b>3003</b>	1.924E+01	1.531E+00	<b>3641</b>	4.196E+01	3.339E+00
<b>3007</b>	2.073E+01	1.649E+00	<b>3645</b>	3.121E+01	2.484E+00
<b>3011</b>	2.476E+01	1.970E+00	<b>3649</b>	2.935E+01	2.336E+00
<b>3015</b>	2.356E+01	1.875E+00	<b>3653</b>	3.854E+01	3.067E+00
<b>3021</b>	1.940E+01	1.544E+00	<b>3655</b>	3.719E+01	2.960E+00
<b>3025</b>	2.630E+01	2.093E+00	<b>3659</b>	3.545E+01	2.821E+00
<b>3028</b>	2.996E+01	2.384E+00	<b>3664</b>	4.555E+01	3.625E+00
<b>3032</b>	3.684E+01	2.932E+00	<b>3669</b>	3.598E+01	2.863E+00
<b>3038</b>	4.151E+01	3.303E+00	<b>3673</b>	3.119E+01	2.482E+00
<b>3041</b>	4.691E+01	3.733E+00	<b>3677</b>	3.106E+01	2.471E+00
<b>3046</b>	6.258E+01	4.980E+00	<b>3682</b>	3.250E+01	2.586E+00
<b>3050</b>	7.318E+01	5.823E+00	<b>3687</b>	3.782E+01	3.010E+00
<b>3051</b>	7.510E+01	5.976E+00	<b>3692</b>	4.086E+01	3.251E+00
<b>3054</b>	8.833E+01	7.029E+00	<b>3697</b>	4.329E+01	3.445E+00
<b>3054</b>	9.235E+01	7.349E+00	<b>3702</b>	3.229E+01	2.570E+00
<b>3058</b>	1.086E+02	8.644E+00	<b>3707</b>	2.052E+01	1.633E+00
<b>3062</b>	1.151E+02	9.162E+00	<b>3712</b>	1.445E+01	1.150E+00
<b>3066</b>	1.041E+02	8.284E+00	<b>3717</b>	1.527E+01	1.215E+00

3068	1.066E+02	8.480E+00	3722	2.693E+01	2.143E+00
3069	9.862E+01	7.848E+00	3727	3.635E+01	2.892E+00
3073	8.285E+01	6.593E+00	3731	4.971E+01	3.955E+00
3073	7.827E+01	6.228E+00	3732	5.400E+01	4.297E+00
3074	7.280E+01	5.793E+00	3735	6.264E+01	4.984E+00
3078	6.158E+01	4.900E+00	3737	6.327E+01	5.035E+00
3081	5.313E+01	4.228E+00	3739	1.065E+02	8.478E+00
3087	4.014E+01	3.194E+00	3740	8.287E+01	6.594E+00
3092	3.421E+01	2.722E+00	3742	9.715E+01	7.731E+00
3096	2.986E+01	2.376E+00	3744	1.057E+02	8.412E+00
3096	3.832E+01	3.050E+00	3745	1.119E+02	8.904E+00
3099	4.143E+01	3.297E+00	3747	1.082E+02	8.608E+00
3102	5.094E+01	4.054E+00	3750	1.108E+02	8.820E+00
3104	6.995E+01	5.566E+00	3753	1.067E+02	8.491E+00
3107	9.648E+01	7.678E+00	3755	8.763E+01	6.974E+00
3110	1.107E+02	8.805E+00	3758	7.771E+01	6.184E+00
3114	9.766E+01	7.771E+00	3761	6.152E+01	4.895E+00
3114	8.891E+01	7.075E+00	3764	5.371E+01	4.274E+00
3119	7.443E+01	5.923E+00	3767	4.748E+01	3.778E+00
3119	7.516E+01	5.981E+00	3770	4.709E+01	3.748E+00
3124	8.733E+01	6.950E+00	3776	4.729E+01	3.763E+00
3124	8.007E+01	6.372E+00	3782	5.557E+01	4.422E+00
3128	6.070E+01	4.830E+00	3786	6.321E+01	5.030E+00
3132	5.837E+01	4.645E+00	3791	7.618E+01	6.062E+00
3132	5.033E+01	4.005E+00	3796	1.029E+02	8.186E+00
3134	4.984E+01	3.966E+00	3798	1.161E+02	9.241E+00
3136	4.226E+01	3.363E+00	3803	1.376E+02	1.095E+01
3136	5.321E+01	4.234E+00	3805	1.706E+02	1.358E+01
3142	3.744E+01	2.979E+00	3808	1.599E+02	1.272E+01
3148	5.109E+01	4.066E+00	3810	1.571E+02	1.250E+01
3152	3.562E+01	2.835E+00	3814	1.529E+02	1.216E+01
3158	2.429E+01	1.933E+00	3818	1.452E+02	1.156E+01
3163	3.011E+01	2.396E+00	3821	1.203E+02	9.576E+00
3168	3.071E+01	2.444E+00	3823	1.077E+02	8.572E+00
3175	2.795E+01	2.224E+00	3826	7.008E+01	5.577E+00
3178	3.565E+01	2.837E+00	3831	6.640E+01	5.284E+00
3182	5.038E+01	4.009E+00	3837	1.058E+02	8.423E+00
3183	6.169E+01	4.909E+00	3839	1.121E+02	8.923E+00
3183	6.139E+01	4.885E+00	3844	1.113E+02	8.858E+00
3185	6.113E+01	4.864E+00	3849	1.310E+02	1.043E+01
3188	5.101E+01	4.059E+00	3853	1.350E+02	1.074E+01
3193	5.919E+01	4.710E+00	3857	9.554E+01	7.603E+00
3198	7.293E+01	5.804E+00	3862	8.387E+01	6.674E+00
3203	9.232E+01	7.347E+00	3866	6.989E+01	5.562E+00
3205	1.048E+02	8.339E+00	3872	4.258E+01	3.388E+00
3208	1.287E+02	1.024E+01	3877	2.973E+01	2.366E+00
3210	1.268E+02	1.009E+01	3882	2.984E+01	2.374E+00
3212	1.140E+02	9.071E+00	3887	2.749E+01	2.188E+00
3214	1.025E+02	8.153E+00	3892	3.201E+01	2.547E+00
3217	7.537E+01	5.998E+00	3897	3.833E+01	3.050E+00
3223	7.563E+01	6.019E+00	3901	7.736E+01	6.156E+00
3223	7.310E+01	5.817E+00	3906	9.250E+01	7.361E+00

<b>3227</b>	7.814E+01	6.218E+00	<b>3911</b>	7.738E+01	6.158E+00
<b>3233</b>	8.282E+01	6.590E+00	<b>3916</b>	8.619E+01	6.859E+00
<b>3238</b>	9.498E+01	7.558E+00	<b>3921</b>	8.695E+01	6.919E+00
<b>3242</b>	1.284E+02	1.021E+01	<b>3925</b>	7.877E+01	6.269E+00
<b>3243</b>	1.692E+02	1.346E+01	<b>3930</b>	8.102E+01	6.447E+00
<b>3244</b>	1.864E+02	1.483E+01	<b>3935</b>	9.564E+01	7.611E+00
<b>3245</b>	1.475E+02	1.174E+01	<b>3940</b>	8.103E+01	6.448E+00
<b>3247</b>	1.016E+02	8.085E+00	<b>3944</b>	7.967E+01	6.340E+00
<b>3250</b>	9.433E+01	7.506E+00	<b>3947</b>	9.887E+01	7.867E+00
<b>3257</b>	7.969E+01	6.341E+00	<b>3950</b>	1.173E+02	9.336E+00

Tabela C1.1) secção eficaz (mbarn) e secção eficaz diferencial (mbarn/sr) para a reacção  $^{31}(\text{p,p}'\gamma)^{31}\text{P}$  para a gama de energias 2621 – 3257 keV.

De seguida são apresentados os pareceres das comissões de ética dos centros hospitalares aos quais se estendeu o pedido de autorização para recolha de amostras ósseas. Para tal foi preciso apresentar um documento com uma contextualização do trabalho, objetivos e plano de

### Autorização do Centro Hospitalar Lisboa Ocidental



#### PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

Projeto de Doutoramento, Título
“Estudo por Técnicas Nucleares da Doença Óssea de Paget”

Após reunião de 05 de novembro de 2012 e, no seguimento da receção dos documentos solicitados, estando o projeto de acordo com as normas de submissão impostas por esta CE, deliberou-se emitir *parecer favorável* sobre a realização do mesmo.

A Comissão de Ética solicita ao Investigador Principal que, quando da conclusão deste estudo/projeto, lhe seja enviada uma síntese dos resultados e conclusões do mesmo.

Ouvido o Relator, o processo foi votado pelos Membros da Comissão de Ética do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental presentes em reunião de 05 de novembro de 2012:

Presidente: Prof.ª Doutora Maria Teresa Marques

Dr. Carlos Costa, Padre João Valente, Dr. José Santana Carlos, Enf.ª Clara Carvalho,  
Dra. Paula Peixe, Dra. Helena Farinha, Dr. Rui Teles

Pelo exposto, emitiu-se a 12 de novembro de 2012, **parecer favorável**.

Presidente da Comissão de Ética

Prof.ª Doutora Maria Teresa Marques

MARIA TERESA MARQUES  
Presidente da Comissão de Ética

## DECLARAÇÃO

Eu, abaixo assinado, **Prof. Doutor José Guimarães Consciência**, Diretor do serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital São Francisco Xavier, declaro que o projeto que me foi apresentado, sobre o estudo ósseo com técnicas nucleares na doença de Paget, no contexto do doutoramento na Universidade Nova de Lisboa, da doutoranda Cátia Sofia Ribeiro dos Santos, Mestre em Eng. Biomédica pela FCT/UNL, que irá ser realizado sob Orientação da Prof. Doutora Adelaide Pedro de Jesus da FCT/UNL e Prof. Doutor Jaime da Cunha Branco da FCM/UNL, me parece ter interesse científico e clínico, respeitando a colaboração do meu serviço todas as exigências de segurança, privacidade e bem-estar dos pacientes, habitualmente requeridas.

Assim, o Serviço de Ortopedia e Traumatologia do CHLO apoiará este projecto, através da recolha de amostras de osso, conforme documentação anexa detalhada, que acompanha esta declaração.

Lisboa, 22 de Agosto de 2012



Prof. Doutor José Guimarães Consciência

**Diretor do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do CHLO**

**Centro Hospitalar do Barlavento Algarvio**

**Secretariado Esp. Cirurgicas 1**

De: "Álvaro Botelho" <abotelh@gmail.com>  
 Para: "Secretariado Esp. Cir. 1" <secespcir1@hbalgarvio.min-saude.pt>  
 Enviado: quarta-feira, 6 de Março de 2013 12:54  
 Assunto: Fwd: Apresentação de Projecto / Pedido de Colaboração

----- Mensagem encaminhada -----  
 De: **Cátia Santos** <catiasrsantos@hotmail.com>  
 Data: 6 de março de 2013 12:46  
 Assunto: Apresentação de Projecto / Pedido de Colaboração  
 Para: abotelh@gmail.com

Bom dia Dr. Álvaro Botelho,

O meu nome é Cátia Santos e sou aluna de doutoramento da Universidade Nova de Lisboa - Faculdade de Ciências de Tecnologia e do Centro de Física Nuclear da Universidade de Lisboa, orientada pela Prof. Adelaide Jesus e pelo Dr. Jaime Branco. O meu projecto de doutoramento intitula-se "Estudo por Técnicas Nucleares da Doença Óssea de Paget" e está dividido em duas partes principais. A primeira parte consiste no estudo do metabolismo do cálcio e a segunda parte no estudo da distribuição dos elementos majoritários e traço em amostras ósseas afectadas com DOP, com uma técnica nuclear denominada "Emissão de raios X induzida por partículas carregadas" (Particle Induced X-ray Emission, PIXE). Estas análises são realizadas no Campus Tecnológico e Nuclear do Instituto Superior Técnico. As amostras ósseas analisadas são pequenos pedaços de osso que são removidos em cirurgias ortopédicas e que normalmente não são aproveitados. No entanto, para podermos aproveitar esses pedaços de osso desperdiçados, precisamos do consentimento informado do paciente e portanto, da autorização da comissão de ética do hospital. Este projecto já obteve aprovação da comissão de ética do hospital Egas Moniz, mas dado o número diminuto de pessoas com DOP que são submetidas a cirurgia no CHLO, sentimos necessidade de uma colaboração mais alargada, com outros hospitais do país. O dossier que entregamos à comissão de ética deve incluir uma declaração do director do serviço de ortopedia autorizando o referido estudo.

Sabe informar-me quantos pacientes com DOP são operados no seu serviço anualmente? Achamos que este tipo de estudos é importante e pode contribuir para um maior conhecimento científico da DOP, nomeadamente no que diz respeito à sua etiologia. Nesse sentido achamos que uma colaboração com o vosso serviço seria de grande interesse e fundamental para este projecto.

Com os melhores cumprimentos,

Cátia Santos

*Sigra Ex. Conselho de Administração e a Ex. Comissão de Ética*  
*Para o seu fto. sig. de CHLO*  
*de pte. de pte. de Comissão de Ética e de Conselho de Administração*  
*Portugal 6/3/13 - Alvaro Botelho*

06-03-2013



INSTITUTO S. JOÃO DE DEUS  
Sede

Exma. Senhora:  
Dra. Cátia Sofia Ribeiro dos Santos

[catiasrsantos@gmail.com](mailto:catiasrsantos@gmail.com)

CC. Diretor do Hospital S. João de Deus  
Montemor-o-Novo

Lisboa, 2013.12.12  
Ref.<sup>a</sup>. ISJD-O-157/2013

**Assunto:** *Aprovação para “Estudo sobre a Doença Óssea de Paget.”*

Exma. Senhora Cátia Sofia Ribeiro dos Santos

Venho por este meio comunicar-lhe que a Comissão de Ética do Instituto S. João de Deus, após análise do seu pedido de investigação e esclarecimentos posteriores, não encontrando objeções no mesmo, emitiu um parecer favorável.

A Direção do Instituto S. João de Deus, face à informação da Comissão de Ética, não vê objeções para a realização do referido estudo, no Hospital S. João de Deus de Montemor – o- Novo, pelo que lhe recomenda que entre em contacto com o Diretor daquele Estabelecimento a fim se dar seguimento ao seu projeto.

Sem outro assunto de momento, com votos de uma boa execução do projeto, ficamos a aguardar a publicação dos resultados do mesmo.

Apresento os melhores cumprimentos.



Irmão José António Gaspar Louro

Presidente do ISJD





### CONSENTIMENTO INFORMADO

#### *Informação*

##### **Estudo da doença óssea de Paget**

A Doença de *Paget* (*Paget's osteitis deformans*), é uma doença óssea que afeta geralmente pessoas com idades superiores a 40 anos. Estima-se que a sua incidência seja de cerca de 3% na população adulta. Em Portugal existe uma percentagem significativa de pessoas afetadas a viver no Alentejo. Os sintomas desta doença são, entre outros, as dores ósseas, as deformidades, as osteoartrites, as fraturas e a estenose vertebral.

O objetivo deste estudo é contribuir para o esclarecimento das causas da doença óssea de *Paget* através da análise de amostras de osso utilizando uma técnica nuclear denominada PIXE (emissão de raios-X induzida por partículas carregadas), a qual vai permitir aceder ao conteúdo mineral do osso, quantificando minerais essenciais, como o cálcio e o fósforo.

**As amostras de osso para este estudo são doadas por pacientes que pela sua situação clínica são encaminhados para o serviço de ortopedia e traumatologia do Hospital São Francisco Xavier para serem submetidos a intervenção cirúrgica, mas apenas quando no decorrer dessa intervenção, se tenha de remover pequenos pedaços de osso, que habitualmente não são aproveitados. O que se pretende agora é proceder ao seu aproveitamento/utilização para estudo e investigação, tendo em vista a realização do interesse público.**

As amostras serão colhidas de pacientes com doença óssea de Paget, osteoporose, e daqueles que, embora sem qualquer doença óssea, são propostos para cirurgia por indicação médica.

Os resultados serão totalmente anónimos e confidenciais.

**Portanto, pretendemos o devido consentimento para colhermos as amostras ósseas mencionadas, exclusivamente nas situações atrás descritas, e com a finalidade referida.**

Para mais informações, poderá ainda contactar a Sra. Prof. Adelaide Pedro de Jesus, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Departamento de Física, Quinta da Torre 2829-516 Caparica, Tel. 212948576.

---



### ***Consentimento***

Declaro que concordo com o que foi proposto e explicado, e que fiquei suficientemente esclarecido (a) no que respeita à recolha e utilização das amostras ósseas no âmbito do Estudo sobre a doença óssea de Paget. Autorizo a entrega de amostras ósseas que me forem retiradas para efeitos do referido estudo.

Concordo que os dados obtidos sejam inseridos no estudo e portanto, divulgados de forma anónima.

Data: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Conforme BI/Cartão do Cidadão – Juntar fotocópia deste documento de identificação

\_\_\_\_\_

### ***Consentimento – Doente menor de idade ou incapaz (seu representante legal ou tutor / curador)***

Declaro, na qualidade de representante legal do doente \_\_\_\_\_ que concordo com o que foi proposto e explicado, tendo ficado suficientemente esclarecido(a), no que respeita à recolha e utilização das amostras ósseas no âmbito do Estudo sobre a doença óssea de Paget. Nessa condição, autorizo a entrega de amostras ósseas que forem retiradas ao doente supra identificado para efeitos do referido estudo.

Concordo que os dados obtidos sejam inseridos no estudo em causa e divulgados de forma anónima.

Data: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

(conforme BI/Cartão do Cidadão – juntar fotocópia deste documento de identificação e documento comprovativo da qualidade de representante legal do doente, caso não se trate de uma situação de exercício do poder paternal).

Título do Projecto:

---

## **Estudo por Técnicas Nucleares da Doença Óssea de Paget**

25 de Março de 2013

Tese de doutoramento a ser desenvolvida por Cátia Sofia Ribeiro dos Santos, sob a supervisão de Prof. Adelaide Pedro de Jesus (FCT/UNL) e Prof. Jaime Da Cunha Branco (FCM/UNL).

# Objectivos

O objectivo final deste estudo é contribuir para o esclarecimento das causas da Doença Óssea de *Paget*. A DOP (*Paget's osteitis deformans*) é uma displasia óssea caracterizada por um distúrbio do processo normal de remodelação óssea e que afecta geralmente pessoas mais velhas com idades superiores a 40 anos. A incidência estima-se como sendo 3% da população adulta. Em Portugal existe uma percentagem significativa de pessoas afectadas no Alentejo. Os sintomas para o sistema músculo - esquelético, são dores ósseas, deformidades, surdez, artropatias degenerativas, estenose vertebral, sintomas neurológicos e fracturas patológicas. Os pacientes têm também uma maior susceptibilidade para osteossarcoma [1, 2].

Em tecidos ósseos afectados com DOP verificam-se várias alterações histológicas, sobretudo ao nível dos osteoclastos, e estas anormalidades podem induzir alterações na concentração dos elementos principais e na sua distribuição no osso. Para analisar estas possíveis alterações, recorre-se a uma técnica analítica nuclear, PIXE (emissão de raios-X induzida por partículas carregadas) associada a microsonda nuclear, instalada no Campus Tecnológico e Nuclear do Instituto Superior Técnico.

A técnica de PIXE permite a identificação e quantificação dos elementos presentes nas amostras e, associada a microsonda nuclear permite a obtenção de mapas dos vários elementos, nomeadamente de cálcio e de fósforo, principais constituintes minerais da estrutura óssea. Analisando esta informação e comparando os mapas obtidos para ossos do grupo de controlo (sem doença) e para ossos do grupo de referência (com doença) pretende-se estabelecer um padrão morfológico e celular característico da doença. Pretende-se também fazer uma comparação com os resultados obtidos para outras doenças, amplamente estudadas, nomeadamente a osteoporose e o cancro ósseo, sobre as quais há muitos resultados publicados.

O objectivo final é contribuir para uma melhor compreensão da origem da doença e estabelecer um padrão característico que poderá ser útil para um diagnóstico precoce ou no desenvolvimento de tratamento específico e direccionado. [10, 11, 12]

# Resumo do Protocolo

Neste protocolo são abordados os estudos da distribuição dos elementos majoritários e traço no osso por PIXE (emissão de raios-X induzida por partículas carregadas), referindo-se os critérios de inclusão dos participantes no estudo, duração do estudo, dimensão da amostra. É também apresentado o protocolo clínico estabelecido com o Serviço de Ortopedia do Centro Hospitalar do Barlavento Algarvio no sentido de obter amostras ósseas removidas (devido a causas clínicas e acidentes) por cirurgia. As amostras ósseas serão de 3 tipos: a) alteradas por DOP, b) alteradas por osteoporose (para comparação, dado existirem muitos estudos sobre esta doença) e, c) saudáveis.

# Estudos de PIXE

O plano de trabalho inclui o estabelecimento de um protocolo com o Serviço de Ortopedia do Centro Hospitalar do Barlavento Algarvio no sentido de se obter amostras ósseas, nomeadamente da cabeça do fémur, removidas (devido a causas clínicas e acidentes) por cirurgia: amostras ósseas alteradas por doença de Paget, amostras ósseas alteradas por osteoporose (para comparação, dado existirem muitos estudos sobre esta doença) e amostras ósseas saudáveis.

A escolha dos participantes neste estudo também deve seguir alguns critérios base visto que a morfologia do osso é afectada por diferentes parâmetros intrínsecos aos indivíduos, nomeadamente o sexo e a idade. Estes parâmetros são iguais para o grupo de referência (pacientes com doença de *Paget* e com osteoporose) e para o grupo de controlo (pacientes que não têm qualquer doença óssea). Os **CRITÉRIOS DE INCLUSÃO** das amostras e de divisão das amostras por grupos dentro dos quais poderá haver uma comparação viável dos resultados são:

- Idade:  $50 \pm 10$  anos;
- Pacientes do sexo feminino pós – menopausa (pelo menos 12 meses após a menopausa);
- Os pacientes do grupo de controlo, não deverão ter nenhuma doença óssea. Os pacientes do grupo de referência não podem ter nenhuma outra doença óssea para além da DOP;
- Os pacientes incluídos no grupo de referência não tomam quaisquer medicamentos que possam interferir com o osso ou com o metabolismo do cálcio (terapia de reposição hormonal ou bifosfonatos);
- Dá-se preferência aos pacientes que tenham efectuado pelo menos um exame de raios-X, DXA, pQCT ou de RM nos últimos seis meses.

Os indivíduos serão devidamente informados acerca do estudo, verbalmente e por escrito. É obtido o consentimento informado de todos os voluntários para disponibilização do material biológico. As cartas do consentimento informado encontram-se neste *dossier*. As amostras

serão devidamente condicionadas em frascos com etanol para conservar a informação biológica.

**DURAÇÃO DO ESTUDO:** 24 meses.

**DIMENSÃO DA AMOSTRA:** Não se estabelece um limite superior para a dimensão da amostra. A estatística associada aos resultados obtidos será tanto melhor quanto maior a dimensão da amostra. O número de amostras não deverá ser inferior a 25.

# PROPOSTA DE PROTOCOLO

---

Para um estudo sobre a Doença Óssea de *Paget*, no âmbito de Tese de doutoramento a ser desenvolvida por Cátia Sofia Ribeiro dos Santos, sob a supervisão de Prof. Adelaide Pedro de Jesus (FCT/UNL) e Prof. Jaime Da Cunha Branco (FCM/UNL), é estabelecido este acordo entre o grupo de investigação e o Serviço de Ortopedia do Centro Hospitalar do Barlavento Algarvio, para a obtenção de amostras ósseas, nomeadamente da cabeça do fémur, removidas (devido a causas clínicas e acidentes) por cirurgia: amostras ósseas alteradas por doença de *Paget*, amostras ósseas alteradas por osteoporose e amostras ósseas saudáveis.

Para o efeito foi redigido uma declaração de consentimento informado para ser assinada pelos pacientes, declaração anexa a este documento.

Competirá ao grupo de investigação:

1. Fazer a entrega na instituição hospitalar de cópias em papel desta declaração.
2. Fornecer os recipientes e meio de conservação para o armazenamento das amostras ósseas.
3. Recolher as amostras ósseas da instituição hospitalar/serviço médico.

Competirá à (ao) instituição hospitalar/serviço médico:

1. Obter a assinatura dos pacientes.
2. Armazenar nos recipientes e meios fornecidos as amostras ósseas removidas com indicação do tipo de amostra (sã ou doente e tipo de doença); neste contexto é importante realçar que do ponto de vista do estudo as amostras poderão ter dimensões pequenas, isto é apresentar áreas da ordem de 9 mm<sup>2</sup>.

# Questões Éticas

O objectivo deste trabalho é tentar compreender e conhecer melhor a Doença Óssea de *Paget*, nomeadamente a sua etiologia e padrões característicos da doença por forma a ser envidados esforços no sentido de um diagnóstico precoce da doença, tratamento direccionado e quem sabe até prevenção. Dado o tipo de procedimento, este projecto de investigação foi precedido de uma cuidadosa avaliação dos riscos e incómodos previsíveis. Pensamos que os benefícios decorrentes deste projecto, para os indivíduos que participam no estudo e para todos os indivíduos afectados com DOP, justificam os procedimentos descritos.

Nenhuma intervenção será realizada sem o consentimento informado do paciente. Serão cuidadosamente explicados verbalmente e por escrito (carta de consentimento informado) todos os procedimentos e inconvenientes.

As amostras de osso recolhidas não são resultado de intervenção invasiva em virtude do estudo. Quando um paciente é submetido a uma cirurgia, existem na grande maioria dos casos, pedaços de osso removidos durante o procedimento cirúrgico e que não são aproveitados. O que se pretende é, mediante consentimento informado do paciente, aproveitar essas amostras de osso para estudos da composição elementar do osso doente (DOP e osteoporose) e saudável. É importante realçar que as amostras de osso para este estudo são doadas por pacientes que pela sua situação clínica são submetidos a intervenção cirúrgica, mas apenas quando no decorrer dessa intervenção, se tenha de remover pequenos pedaços de osso que habitualmente não são aproveitados.

**Serão respeitados os princípios da Declaração de Helsínquia, da convenção sobre os direitos do homem e a biomedicina e das “*Guidelines for Good Clinical Practice*” da Organização Mundial de Saúde.**



# Referências Bibliográficas

- [1] – Langston A. L.; Ralston S.H.; Rheumatology 2004;43:955–959;
- [2] – Helfrich, Miep H.; Hocking, Lynne J.; Archives of Biochemistry and Biophysics 473 (2008) 172 – 182;
- [3] – Denk, Eberhard; hillegonds, Darren; Hurrell, Richard F.; Vogel, John; Fettingner, Karin; Häuselmann, Hans J.; Kraenzlin, Marius; Walczyk, Thomas; JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, Volume 22, Number 10, 2007;
- [4] – Siris, Ethel S.; Journal of Bone and Mineral Research, volume 13, number 7, 1998;
- [5] – Annu. Rev. Nucl. Part. Sci. 1990.40:411-438;
- [6] – Johnson RR, Berkovits D, Boaretto E, Gelbart Z, Ghelberg S, Meirav O, Paul M, Prior J, Sossi V, Venczel E (1994) Nucl Instrum Meth B 92:483–488;
- [7] – Freeman S, Beck B, Bierman JM, Caffee MW, Heaney RP, Holloway L, Marcus R, Southon JR, Vogel JS (2000) Nucl Instrum Meth B 172:930–933;
- [8] – Fitzgerald RL, Hillegonds DJ, Burton DW, Griffin TL, Mullaney S, Vogel JS, Deftos LJ, Herold DA (2005) Clin Chem 51:2095–2102;
- [9] – Early detection of Bone Disease; Detecting Bone Cancer S&TR December 2006;
- [10] – Zhang, Y.X.; Wang, Y.S.; Zhang, Y.P.; Zhang, G.L.; Huang, Y.Y.; He, W.; Investigation of elemental distribution in human femoral head by PIXE and SRXRF microprobe; Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms; Volume 260, Issue 1, July 2007, Pages 178–183;
- [11] – Kabbar, W.; Gundogdu, O.; Lakloul, A.; Bunk, O.; Pfeiffer, F.; Farquharson, M. J.; Bradley, D. A.;  $\mu$  - PIXE and SAXS studies at bone – cartilage interface; Applied Radiation and Isotopes 68 (2010), 730 – 734;
- [12] – Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A 467–468 (2001) 1301–1304; Volume 229, Issue 2, March 2005, Pages 281–292;

## Anexo 3

As tabelas que se seguem apresentam os resultados da análise por PIXE dos materiais de referência padrão, obtidos para várias energias do feixe incidente.

	Valores Experimentais			Valores do Certificado
Elemento	Concentração (%m/m)			Concentração (%m/m)
<b>K</b>	1.467	±	0.364	1.000
<b>Ca</b>	9.887	±	0.285	8.560
<b>Ti</b>	0.109	±	0.033	0.089
<b>Mn</b>	0.245	±	0.011	0.250
<b>Fe</b>	0.375	±	0.014	0.340
<b>Co</b>	0.049	±	0.008	0.046
<b>Ni</b>	0.098	±	0.013	0.099
<b>Cu</b>	2.694	±	0.071	2.660
<b>Zn</b>	0.281	±	0.024	0.190
<b>Sr</b>	0.040	±	0.012	0.019
<b>Pb</b>	0.679	±	0.029	0.610

Tabela C3.1) Resultados da análise por PIXE, na câmara de reações nucleares do CTN/IST, do material de referência padrão Corning Standard B usando um feixe de prótons com 2400 keV de energia.

	Valores Experimentais			Valores do Certificado
Elemento	Concentração (mg/g)			Concentração (mg/g)
<b>K</b>	14.248	±	0.838	11.300
<b>Ca</b>	15.324	±	0.610	14.800
<b>Ti</b>	0.455	±	0.056	0.380
<b>Mn</b>	0.608	±	0.028	0.550
<b>Fe</b>	0.608	±	0.030	0.520
<b>Co</b>	0.052	±	0.014	0.023
<b>Cu</b>	0.442	±	0.022	0.380
<b>Zn</b>	0.164	±	0.015	0.100
<b>Sr</b>	0.111	±	0.038	0.057
<b>Pb</b>	0.683	±	0.058	0.480

Tabela C3.2) Resultados da análise por PIXE, na câmara de reações nucleares do CTN/IST, do material de referência padrão Corning Standard D usando um feixe de prótons com 2800 keV de energia.

As tabelas que se seguem mostram os resultados da análise simultânea por PIXE e PIGE na câmara de reações do LATR-CTN/IST de algumas secções das amostras de osso saudável, com doença óssea de Paget e com osteoporose, para várias energias do feixe incidente. A técnica de PIGE foi aplicada para quantificação do fósforo e a técnica de PIXE para quantificação dos elementos mais pesados do que o fósforo ( $Z > 31$ ).

### A. Osso Saudável

	Amostra 2								
	PIXE/PIGE 2800keV			PIXE/PIGE 2600keV			PIXE/PIGE 3500keV		
<b>Ca</b>	9.9	±	2.1	10.7	±	0.2	14.8	±	3.3
<b>Zn</b>	106	±	23	146	±	13	125	±	16
<b>Sr</b>	-	-	-	-	-	-	31.7	±	11.3
<b>P</b>	4.5	±	0.6	4.5	±	0.6	5.9	±	0.5
<b>Ca/P</b>	2.2	±	0.3	2.4	±	0.3	2.5	±	0.4

Tabela C4.1) Resultados da análise da secção número 2 de osso saudável por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.

	Amostra 8					
	PIXE/PIGE 2800 keV			PIXE/PIGE 3500 keV		
<b>Ca</b>	18.8	±	1.1	14.7	±	0.6
<b>Zn</b>	188	±	23	114	±	10
<b>Sr</b>	48	±	22	32	±	12
<b>P</b>	11.3	±	0.4	5.8	±	0.4
<b>Ca/P</b>	1.8	±	0.2	2.6	±	0.3

Tabela C4.2) Resultados da análise da secção número 8 de osso saudável por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.

## B. Osso com Doença Óssea de Paget

Amostra 1						
	PIXE/PIGE 3479.9 keV			PIXE/PIGE 2800 keV		
<b>Ca</b>	21.3	±	0.8	21.0	±	1.3
<b>Zn</b>	299	±	25	356	±	28
<b>Sr</b>	52	±	14	83	±	24
<b>P</b>	6.4	±	0.2	5.3	±	0.4
<b>Ca/P</b>	3.4	±	0.2	4.6	±	0.7

Tabela C4.3) Resultados da análise da secção número 1 do osso com DOP por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.

Amostra 2						
	PIXE/PIGE 2611 keV			PIXE/PIGE 2800 keV		
<b>Ca</b>	32.2	±	1.2	31.6	±	1.1
<b>Zn</b>	459	±	40	461	±	312
<b>Sr</b>	81	±	42	102	±	32
<b>P</b>	-	-	-	6.3	±	0.3
<b>Ca/P</b>	-	-	-	5.0	±	0.3

Tabela C4.4) Resultados da análise da secção número 2 do osso com DOP por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.

Amostra 5						
	PIXE/PIGE 2611 keV			PIXE/PIGE 2800 keV		
<b>Ca</b>	28.3	±	0.9	24.9	±	0.6
<b>Zn</b>	319	±	23	358	±	34
<b>Sr</b>	86	±	27	105	±	28
<b>P</b>	-	-	-	6.2	±	0.2
<b>Ca/P</b>	-	-	-	4.0	±	0.3

Tabela C4.5) Resultados da análise da secção número 5 do osso com DOP por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.

Amostra 6						
	PIXE/PIGE 2611 keV			PIXE/PIGE 2800 keV		
<b>Ca</b>	30.0	±	0.5	32.7	±	1.6
<b>Zn</b>	521	±	23	400	±	37
<b>Sr</b>	114	±	33	120	±	46
<b>P</b>	-	-	-	8.1	±	0.1
<b>Ca/P</b>	-	-	-	4.1	±	0.2

Tabela C4.6) Resultados da análise da secção número 6 do osso com DOP por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.

Amostra 10									
	PIXE/PIGE 3479.9 keV			PIXE/PIGE 2611 keV			PIXE/PIGE 2800 keV		
<b>Ca</b>	23.7	±	2.3	22.5	±	0.8	19.4	±	0.6
<b>Zn</b>	221	±	14	265	±	20	288	±	34
<b>Sr</b>	63	±	12	44	±	23	107	±	38
<b>P</b>	6.9	±	0.6	-	-	-	7.8	±	1.2
<b>Ca/P</b>	3.5	±	0.2	-	-	-	2.2	±	0.1

Tabela C4.7) Resultados da análise da secção número 10 do osso com DOP por PIXE e PIGE na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.

### C. Osso osteoporótico 1

Amostra 4						
	PIXE/PIGE 2611.1 keV			PIXE/PIGE 2800 keV		
<b>Ca</b>	15.4	±	0.3	18.4	±	1.2
<b>Zn</b>	139	±	13	128	±	17
<b>Sr</b>	-	-	-	-	-	-
<b>P</b>	-	-	-	6.0	±	0.3
<b>Ca/P</b>	-	-	-	2.7	±	0.2

Tabela C4.8) Resultados da análise da secção número 4 do osso osteoporótico 1 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.

Amostra 10									
	PIXE/PIGE 2800 keV			PIXE/PIGE 2611.1 keV			PIXE/PIGE 3480 keV		
<b>Ca</b>	22.6	±	1.9	23.7	±	1.1	19.4	±	0.8
<b>Zn</b>	172	±	24	188	±	19	133	±	13
<b>Sr</b>	38	±	27	45	±	24	28	±	9
<b>P</b>	6.1	±	0.2	-	-	-	6.0	±	0.3
<b>Ca/P</b>	3.4	±	0.1	-	-	-	3.3	±	0.1

Tabela C4.9) Resultados da análise da secção número 10 do osso osteoporótico 1 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.

## D. Osso Osteoporótico 2

Amostra 3						
	PIXE/PIGE 2611.1 keV			PIXE/PIGE 2800 keV		
<b>Ca</b>	20.4	±	0.8	24.8	±	1.5
<b>Zn</b>	180	±	18	223	±	21
<b>Sr</b>	-	-	-	57	±	23
<b>P</b>	-	-	-	8.4	±	0.6
<b>Ca/P</b>	-	-	-	3.0	±	0.3

Tabela C4.10) Resultados da análise da secção número 3 do osso osteoporótico 2 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.

Amostra 4						
	PIXE/PIGE 2611.1 keV			PIXE/PIGE 2800 keV		
<b>Ca</b>	20.5	±	0.3	17.0	±	1.0
<b>Zn</b>	198	±	14	192	±	19
<b>Sr</b>	48	±	22	61	±	23
<b>P</b>	-	-	-	6.2	±	0.3
<b>Ca/P</b>	-	-	-	2.8	±	0.2

Tabela C4.11) Resultados da análise da amostra secção número 4 do osso osteoporótico 2 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.

Amostra 9									
	PIXE/PIGE 3479.9 keV			PIXE/PIGE 2611.1 keV			PIXE/PIGE 2800 keV		
<b>Ca</b>	15.5	±	0.7	20.3	±	0.6	21.6	±	2.3
<b>Zn</b>	122	±	13	186	±	16	257	±	31
<b>Sr</b>	32	±	11	42	±	20	64	±	28
<b>P</b>	5.5	±	0.2	-	-	-	6.6	±	0.6
<b>Ca/P</b>	2.8	±	0.2	-	-	-	3.3	±	0.2

Tabela C4.12) Resultados da análise da secção número 9 do osso osteoporótico 2 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.

### E. Osso Osteoporótico 3

Amostra 2						
	PIXE/PIGE 2800 keV			PIXE/PIGE 2611.1 keV		
Ca	33.0	±	1.2	39.7	±	0.7
Zn	268	±	60	363	±	22
Sr	138	±	42	53	±	25
P	7.6	±	0.1	-	-	-
Ca/P	3.3	±	0.3	-	-	-

Tabela C4.13) Resultados da análise da secção número 2 do osso osteoporótico 3 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.

Amostra 8									
	PIXE/PIGE 2800 keV			PIXE/PIGE 2611.1 keV			PIXE/PIGE 3479.9 keV		
<b>Ca</b>	20.8	±	1.5	23.6	±	0.8	20.2	±	3.6
<b>Zn</b>	242	±	40	244	±	20	-	-	-
<b>Sr</b>	71	±	32	47	±	22	-	-	-
<b>P</b>	10.6	±	0.9	-	-	-	8.3	±	0.2
<b>Ca/P</b>	2.0	±	0.1	-	-	-	2.6	±	0.3

Tabela C4.14) Resultados da análise da secção número 8 do osso osteoporótico 3 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.

## F. Osso Osteoporótico 4

Amostra 4						
	2800keV PIXE			2600keV PIXE		
<b>Ca</b>	8.5	±	0.6	8.3	±	0.3
<b>Zn</b>	71	±	11	56	±	6
<b>Sr</b>	-	-	-	16	±	8
<b>P</b>	3.1	±	0.4	-	-	-
<b>Ca/P</b>	2.9	±	0.3	-	-	-

Tabela C4.15) Resultados da análise da secção número 4 do osso osteoporótico 4 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.

Amostra 8									
	2800keV			2600keV			3479.9keV		
	PIXE			PIXE			PIXE		
Ca	5.6	±	0.4	11.0	±	0.5	9.0	±	0.8
Zn	58	±	12	109	±	11	-	-	-
Sr	-	-	-	22	±	15	-	-	-
P	6.4	±	0.1	-	-	-	7.5	±	0.1
Ca/P	0.9	±	0.1	-	-	-	1.2	±	0.2

Tabela C4.16) Resultados da análise da secção número 8 do osso osteoporótico 4 na câmara de reações nucleares do CTN/IST para várias energias do feixe incidente.